ZUR BESTIMMUNG VON CHOLESTEROL IN SERA

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Fawzy El-Yazbi
aus Ägypten

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547603_0027

ZUR BESTIMMUNG VON CHOLESTEROL IN SERA

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Fawzy El-Yazbi
aus Ägypten

1983

Gedruckt mit Unterstützung
des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD).

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Januar 1983
Dekan: Professor Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter: Professor Dr. K.-A. Kovar
2. Berichterstatter: Professor Dr. H. P. T. Ammon

REFO-DRUCK HANS VOGLER TÜBINGEN

Meiner Frau und meinen Kindern danke ich für die Geduld,
die sie mir während dieser Zeit oft entgegenbringen mußten.

Die vorliegende Arbeit wurde im Oktober 1979 unter Anleitung von Prof.Dr.K.-A.Kovar am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen begonnen und im Oktober 1982 abgeschlossen.

Für die wertvollen Anregungen und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit danke ich Herr Professor Dr.K.-A.Kovar sehr herzlich.

Herrn Dr.med.E.Henkel, Oberarzt am Oststadt-Krankenhaus Hannover, danke ich für das Probenmaterial und seine Unterstützung beim statistischen Methodenvergleich sehr herzlich.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst sei für das gewährte Stipendium sowie für die Finanzierung dieser Dissertation gedankt.

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung..... 1

II. Entwicklung neuer Methoden zur Bestimmung von Cholesterol in Sera..... 6

1. Übersicht über enzymatische Bestimmungsmethoden..... 6

(1) Kageyama-Methode..... 6

(2) Trinder-Methode..... 7

(3) Aldehyddehydrogenase-Methode..... 8

2. Umsetzung mit 4-Hydroxyphenylessigsäure.... 8

(1) Optimierung..... 10

(2) Prüfung..... 15

(3) Diskussion..... 21

3. Umsetzung mit 3-Methyl-benzothiazolin-2-onhydrazon/3-(dimethylamino)-benzoesäure..... 24

(1) Optimierung..... 25

(2) Prüfung..... 30

(3) Diskussion..... 36

4. Umsetzung mit 4-Nitrophenylhydrazin..... 38

(1) Methode..... 38

(2) Ergebnisse..... 39

(3) Diskussion..... 42

5. Statistischer Methodenvergleich..... 43

III. Zusammenfassung..... 54

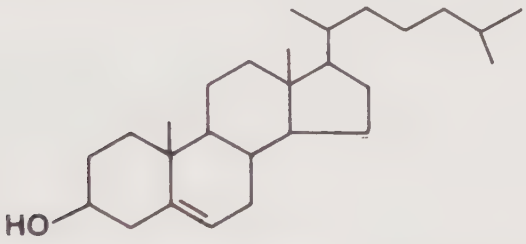
IV. Experimenteller Teil..... 59

V. Anhang:
Cholesteroloxidation mit Ag_2CO_3/Celite..... 88

VI. Literaturverzeichnis..... 95

I. Einleitung

Die Bestimmung des Cholesterols ist eine der am häufigsten durchgeführten Analysen zur Diagnose von Lipidstoffwechselstörungen. Cholesterol wird mit Fettsäuren verestert und wegen seiner schlechten Wasserlöslichkeit hauptsächlich an ß-Lipoproteine gebunden[1]. Diagnostische Bedeutung hat vor allem die Bestimmung der Serumkonzentration des Gesamtcholesterols (freies Cholesterol und Cholesterolester).



Angaben über den Normalbereich des Serumcholesterols sind schwer vergleichbar, da sie in jeder Population als Funktion der Ernährung, des Alters, des Geschlechts und der körperlichen Aktivität differieren[1]. Normalbereiche für enzymatische Verfahren wurden durch Weisshaar[2] beschrieben. Als Referenzwerte für die Cholesterolkonzentration im Serum gelten[3]:

130 - 185 - 264 mg/100 ml ≙ 3,37 - 4,79 - 6,84 mmol/l

Zur Erfassung einer Hypercholesterolämie werden folgende Grenzwerte für das Gesamtcholesterol empfohlen[4]:

Verdächtig: ab 220 mg/100 ml ≙ 5,7 mmol/l

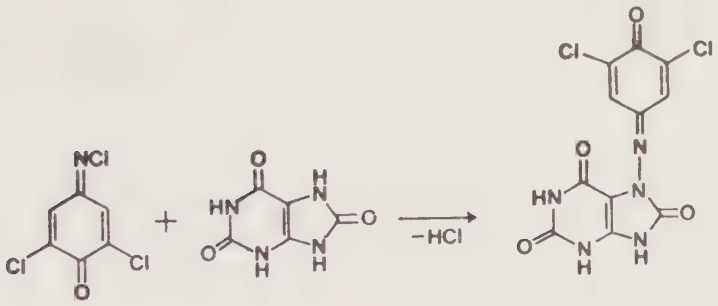
Erhöht : ab 260 mg/100 ml ≙ 6,7 mmol/l

Für den Nachweis steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung. Sie lassen sich alle auf die schon bekannte Liebermann[5]- Burchard[6]-Reaktion zurückführen. Cholesterol reagiert mit Essigsäureanhydrid und konz.Schwefelsäure, wobei im wasserfreien Milieu polymere ungesättigte Kohlenwasserstoffe gebildet werden. Bei diesem Dehydrierungsprozeß entstehen zunehmend konjugierte ungesättigte Systeme. Ihre Absorptionsmaxima liegen bei 412, 478, 563 und 620 nm. Generell wird zwischen einstufigen und mehrstufigen Verfahren unterschieden. Letztere beinhalten eine Extraktion und Isolierung des Cholesterols mit anschließender Farbreaktion. Bei den Einstufenmethoden wird Serum direkt für Farbreaktionen eingesetzt. Alle diese Methoden haben den Nachteil, daß die Farbintensität vom Wassergehalt der Reagenzien, der Schwefelsäurekonzentration, der Belichtung sowie dem Zeitintervall zwischen Zugabe der Reagenzien und Ablesen der Farbintensität abhängig ist. Essigsäureanhydrid extrahiert das Cholesterol, präzipitiert das Eiweiß und garantiert ein wasserfreies Medium. Die Liebermann-Burchard-Reaktion ist eine relativ unspezifische Steroidreaktion.

Richmond[7,8] und Flegg[9] beschrieben erstmals die enzymatische Oxidation von Cholesterol durch Cholesteroloxidase zu Wasserstoffperoxid und Δ^4-Cholestenon nach vorheriger alkalischer Verseifung der Cholesterolester. Die Störanfälligkeit dieser Methode war vor allem auf die Verseifung zurückzuführen. Da im Plasma das Cholesterol zu etwa 75% in veresterter Form vorliegt, wurde von Röschlau[10] eine enzymatische Spaltung der Cholesterolester durch Cholesterolesterase der Oxidationsreaktion vorgeschaltet. Dadurch wurden bessere Möglichkeiten zur vollenzymatischen Bestimmung des Gesamtcholesterols erschlossen. Auf diesem Prinzip beruhen die meisten gebräuchlichen Verfahren zur Gesamtcholesterolbestimmung:

Kageyama Methode[10], Trinder Methode[11,12], Aldehyddehydrogenase Methode[13], Merckotest[14], kinetische Verfahren mit ABTS[15] und polarographische Verfahren[16]. Das Gesamtcholesterol im Serum kann auch mittels gaschromatographischer[17,18] und dünnschichtchromatographischer[19,20,21] Bestimmung erfaßt werden.
Die Einführung einer einfachen und spezifischen Farbreaktion in Verbindung mit einer enzymatischen Methode zur Cholesterolbestimmung, die weder eine Extraktion noch aggressive Reagenzien erfordert, bedeutet einen wesentlichen Fortschritt in der klinisch-chemischen Analytik. Beispiele für ein solches Verfahren sind:

a) Harnsäurebestimmung nach Kovar-Metzger[22]
Harnsäure reagiert mit 2,6-Dichlorchinonchlorimid unter Bildung einer gelben Färbung



Der gebildete Farbstoff[+)] hat ein Absorptionsmaximum bei 436 nm. Da 2,6-Dichlorchinonchlorimid auch mit anderen Verbindungen reagiert, gelingt es durch die Kombination mit dem enzymatischen Abbau der Harnsäure durch Uricase die Methode spezifisch zu gestalten.

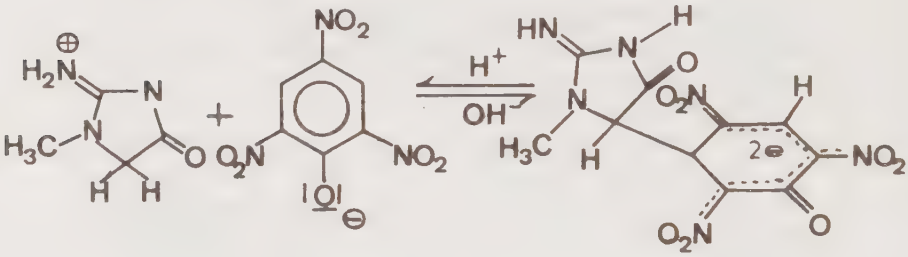
+) Zukünftige Dissertation, M.Teutsch

$$\text{Harnsäure} + 2H_2O + O_2 \xrightarrow{\text{Uricase}} \text{Allantoin} + CO_2 + H_2O_2$$

Die Abbauprodukte reagieren mit dem Farbreagenz nicht. Dadurch läßt sich aus der Differenz eines Reaktionsansatzes mit und ohne Uricase die spezifisch durch das Harnsäurefarbprodukt verursachte Absorption bei 436 nm bestimmen.

b) Kreatininbestimmung nach Kovar-Schmid[23)]

Kreatinin bildet mit einer alkalischen Pikratlösung einen orange-roten Farbstoff aus.



Diese Reaktion ist aber sehr unspezifisch, denn es werden dabei auch zahlreiche Chromogene aus dem Serum erfaßt. Zur Kombination der Jaffé-Reaktion mit einer enzymatischen Methode bot sich die Creatinin-Amidohydrolase an, welche Kreatinin zu Kreatin umsetzt. Kreatin reagiert mit Pikrinsäure im alkalischen Milieu nicht. Aus diesem Grunde ist es möglich, aus der Extinktionsdifferenz eines Reaktionsansatzes mit und ohne Enzyme den Einfluß der Chromogene auf die Farbbildung zu eliminieren. Diese Methode wurde von Kovar-Löhberg[24)] weiter verbessert. Creatinin-Amidohydrolase katalysiert die Gleichgewichtseinstellung

zwischen Kreatinin und Kreatin von beiden Seiten. Die zugesetzte Enzym-Substrat-Mischung (Creatin-Kinase, Pyruvat-Kinase, Lactatdehydrogenase und NADH, ATP, PEP) bewirkt eine vollständige Umsetzung des Kreatinins durch Eliminierung von Kreatin aus dem Reaktionsgleichgewicht. Dadurch steigt gleichzeitig die Empfindlichkeit der Farbreaktion.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung neuer Methoden für die vollenzymatische Bestimmung von Gesamtcholesterol im Serum in Verbindung mit einer Farbreaktion nach dem o.a. Prinzip. Die Verfahren sollen folgenden Anforderungen entsprechen:

- Die Reagenzien sollen wasserlöslich, möglichst stabil und farblos oder nur schwach gefärbt ohne Zusatz von Peroxidase sein.
- Sie sollen keine carcinogenen Eigenschaften besitzen.
- Das Oxidationsprodukt sollte einheitlich, ebenfalls wasserlöslich und möglichst stabil sein und einen hohen Extinktionskoeffizienten aufweisen.

II. Entwicklung neuer Methoden zur Bestimmung von Cholesterol in Sera

1. Übersicht über enzymatische Bestimmungsmethoden

Das Prinzip der vollenzymatischen Gesamtcholesterolbestimmung beruht auf einer Spaltung der Cholesterolester unter Einwirkung der Cholesterolesterase in freies Cholesterol und Fettsäuren. Das freigesetzte Cholesterol wird gleichzeitig mit dem im Serum vorkommenden freien Cholesterol durch die Cholesteroloxidase unter Sauerstoffverbrauch zu Δ^4-Cholestenon und Wasserstoffperoxid umgewandelt.

$$\text{Cholesterolester} + H_2O \xrightarrow[\text{esterase}]{\text{Cholesterol-}} \text{Cholesterol} + \text{Fettsäure}$$

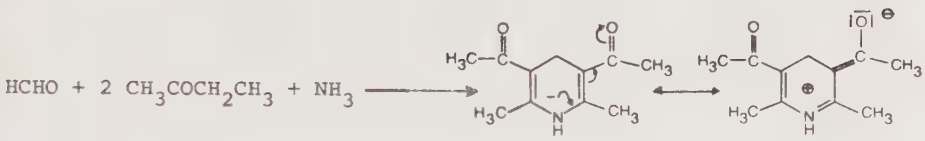
$$\text{Cholesterol} + O_2 \xrightarrow[\text{oxidase}]{\text{Cholesterol-}} \Delta^4\text{-Cholestenon} + H_2O_2$$

Mit den genannten Enzymen erfaßt man sowohl freies Cholesterol als auch die Cholesterolester. Führt man die enzymatische Cholesterolbestimmung in Abwesenheit der Cholesterolesterase durch, so wird mit Cholesteroloxidase nur das freie Cholesterol gemessen. Das veresterte Cholesterol ergibt sich dann aus der Differenz von Gesamt- und freiem Cholesterol.

(1) Kageyama-Methode (Hantzsch-Reaktion)

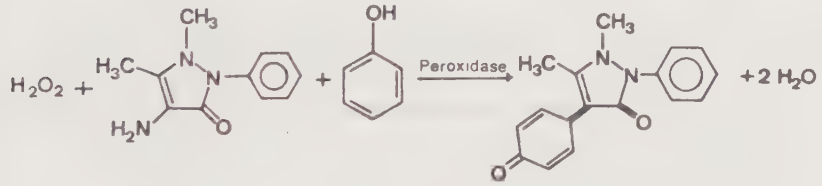
Das o.a. Indikatorsystem wird für die enzymatische Bestimmung der Harnsäure verwendet[25]. Röschlau[10] und Stähler[26] beschrieben diese Methode für die Gesamtcholesterolbestimmung im Serum. Das entstehende Wasserstoffperoxid oxidiert in Anwesenheit von Katalase Methanol zu Formaldehyd. Formaldehyd reagiert mit Ammoniumionen und Acetylaceton unter Bildung eines gelbgefärbten Lutidinfarbstoffes, dessen Farbintensität der Cholesterol-Konzentration proportional ist und bei 405-415 nm gemessen wird.

$$H_2O_2 + CH_3OH \xrightarrow{\text{Katalase}} HCHO + 2\ H_2O$$



(2) Trinder-Methode

Mit Hilfe der Peroxidasereaktion nach Trinder[27] verläuft, wie bei der Glucosebestimmung im Serum, die Reaktion wie folgt:
Wasserstoffperoxid oxidiert 4-Aminophenazon und Phenol unter der katalytischen Wirkung von Peroxidase zu einem 4-(p-Benzochinonmonoimino)-phenazon.



Die Farbintensität dieses roten Chromogens ist der Cholesterolkonzentration proportional und kann zwischen 500-550 nm gemessen werden. Meiattini [28] erzielt durch Austausch des Phenols gegen das stabilere 4-Hydroxybenzoat eine Verbesserung der Reaktion.

(3) Aldehyddehydrogenase-Methode[13)]

Das bei der Umsetzung mit Cholesteroloxidase gebildete H_2O_2 wird nach folgendem Schema bestimmt:

$$H_2O_2 + \text{Ethanol} \xrightarrow{\text{Katalase}} \text{Acetaldehyd} + 2\ H_2O$$

$$\text{Acetaldehyd} + NAD(P)^+ \xrightarrow[\text{dehydrogenase}]{\text{Aldehyd-}} \text{Acetat} + NAD(P)H + H^+$$

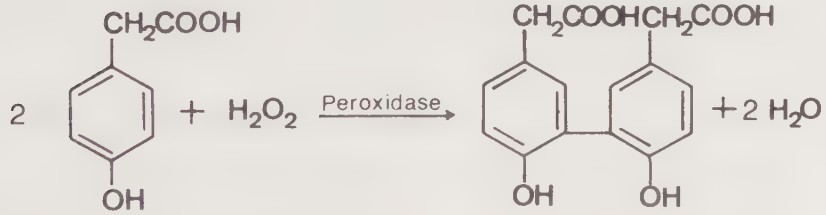
Die Extinktion wird bei 334 oder 340 nm gemessen.

2. Umsetzung mit 4-Hydroxyphenylessigsäure

Sharman[29)] verwendete Ferricyanid als Oxidationsmittel für die fluorimetrische Bestimmung von Homovanillinsäure (3-Methoxy-4-hydroxyphenylessigsäure). Später haben Sato[30)] und Corrodi[31)] umgekehrt Homovanillinsäure für die quantitative Bestimmung von Ferricyanid eingesetzt. Guilbault et al[32)] prüften erfolgreich die Homovanillinsäure als Substrat für die Bestimmung von oxidierenden Enzymen z.B. Peroxidase. Guilbault, Brignac und Zimmer[33)] übertrugen diese Arbeiten auf die Bestimmung von Peroxidase, Glucoseoxidase und Xanthinoxidase. Die Struktur des Oxidationsproduktes wurde von Corrodi und Werdinius[31)] aufgrund der Elementaranalyse und der IR-Auswertungen als 2,2'-Dihydroxy-3,3'-dimethoxybiphenyl-5,5'-diessigsäure ausgegeben. In weiteren Versuchen wurde eine Methode für

die Bestimmung von Galactoseoxidase und Invertase entwickelt. Guilbault, Brignac und Juneau[34] haben weitere 25 Strukturanaloge des Homovanillins geprüft. Dabei erwies sich 4-Hydroxyphenylessigsäure am geeignetsten für die Bestimmung oxidierender Enzyme, da es sich in Wasser gut löst, relativ preiswert ist und nach Oxidation einen hohen Fluoreszenzkoeffizienten aufweist. Aus diesem Grunde wurde 4-Hydroxyphenylessigsäure für die Bestimmung von Monoamino-und Diaminoxidase-Systemen gewählt[35].

Wir übertrugen diese Vorarbeiten auf die Cholesterolbestimmung. Das bei der Umsetzung mit Cholesteroloxidase gebildete Wasserstoffperoxid soll 4-Hydroxyphenylessigsäure unter der katalytischen Wirkung von Peroxidase zu einem stark fluoreszierenden Produkt nachfolgender Struktur umsetzen[35].



Die Überprüfung ergab, daß die Fluoreszenzintensität der Cholesterolkonzentration proportional ist. Die Fluoreszenzkurve zeigt ein Fluoreszenzmaximum von λ_{fl}= 410 nm bei einer Anregungswellenlänge von λ_{ex}= 315 nm (Abb.1).

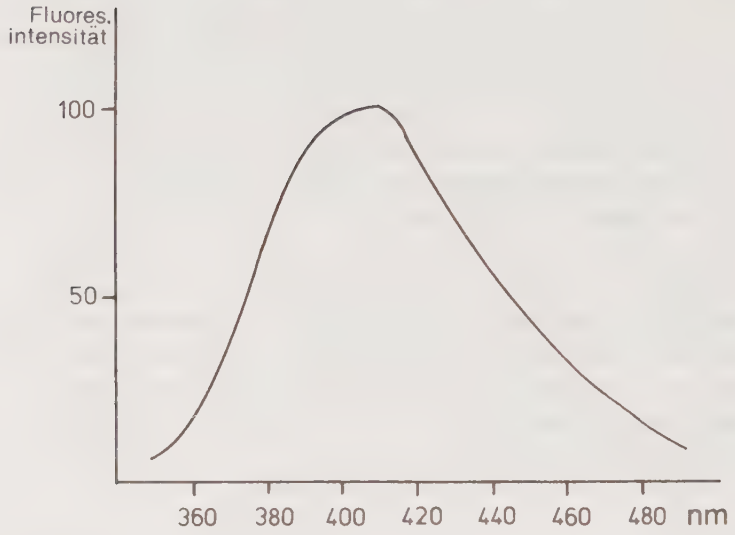


Abb.1: Fluoreszenzkurve mit Cholesterol-Standardlösung (400 mg/100 ml ≙ 10,34 mmol/l)
λ_{fl}= 410 nm, λ_{ex}= 315 nm

(1) Optimierung der Methode

Einfluß des pH-Wertes

Der Einfluß des pH-Wertes wurde über die Oxidationsgeschwindigkeit in einer Standardlösung mit 10,34 mmol/l Cholesterol in 0,1 molarem Phosphatpuffer geprüft. Es wurde in einem pH-Bereich zwischen 7,0 und 8,2 gearbeitet. Abb.2 zeigt, daß in einem Phosphatpuffer mit pH 8,0 ein Maximum der Oxidationsreaktion erreicht wird.

Einfluß des Triton X-100

Triton X-100 (Octylphenol-polyethylenglycol-ether) wurde als Lösungsvermittler für das freie Cholesterol verwendet[15]. Die optimale Konzentration von Triton X-100 für die vollständige Oxidation von 10,34 mmol/l Cholesterol (≙ 400 mg/100 ml) beträgt 0,003 ml pro Bestimmung (Abb.3).

Einfluß der 4-Hydroxyphenylessigsäure

Die optimale Konzentration des Fluorogens 4-Hydroxyphenylessigsäure wurde überprüft. Für eine maximale Reaktion von 10,34 mmol/l Cholesterol (≙ 400 mg/100 ml) sind 0,266 mg 4-Hydroxyphenylessigsäure pro Bestimmung ausreichend (Abb.4).

Einfluß der Cholesteroloxidase-Aktivität

Für die quantitative Oxidation des freien Cholesterols bis zu 10,34 mmol/l (≙ 400 mg/100 ml) bei 37°C sind 0,016 U Cholesteroloxidase pro Bestimmung ausreichend (Abb.5).

Einfluß der Peroxidase-Aktivität

Für die quantitative Oxidation von 4-Hydroxyphenylessigsäure durch H_2O_2 wird Peroxidase als Katalysator benutzt. Vollständige Oxidation von 10,34 mmol/l Cholesterol (≙ 400 mg/100 ml) wird mit 6,4 U Peroxidase pro Bestimmung erreicht (Abb.6).

Kinetik der Reaktion

Abb.7 zeigt den Reaktionsverlauf in Cholesterolstandardlösungen mit 5,17 mmol/l (≙ 200 mg/100 ml) und 10,34 mmol/l (≙ 400 mg/100 ml). Das Maximum der Reaktionsentwicklung wird bei 37°C in 15 min. erreicht.

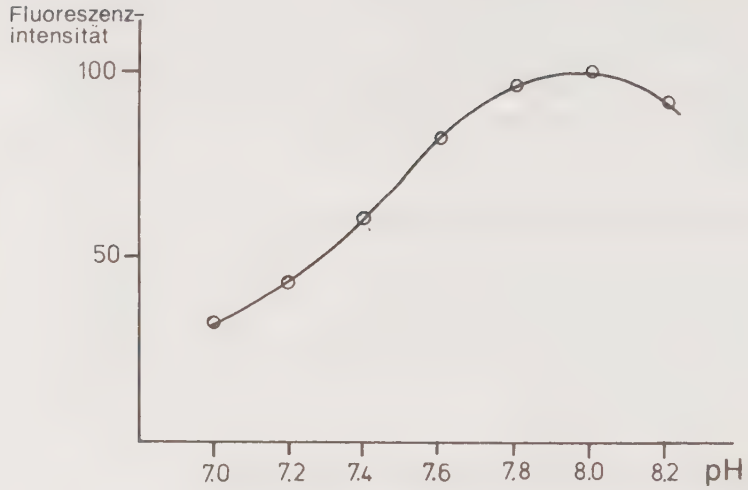


Abb.2: Einfluß des pH-Wertes auf die fluorimetrische Methode

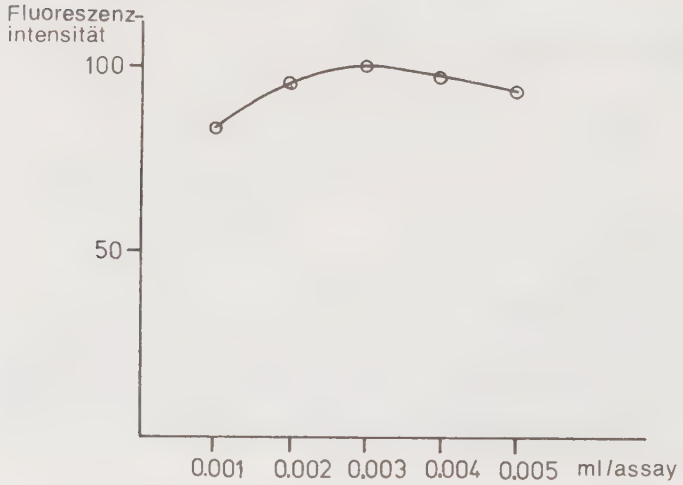


Abb.3: Einfluß des Triton X-100 auf die fluorimetrische Methode

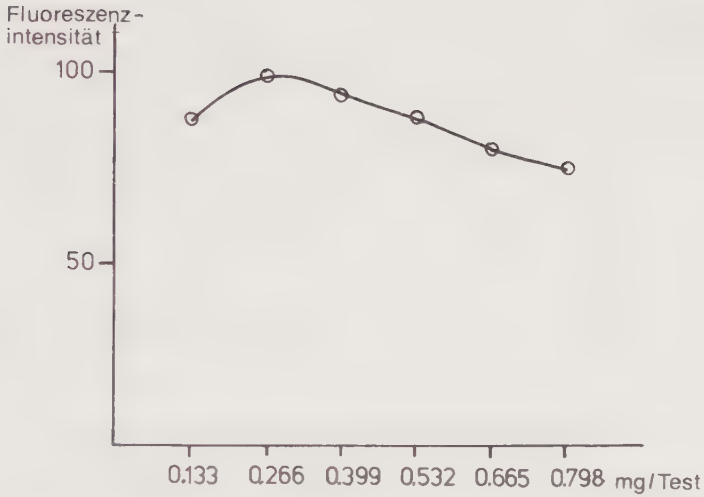


Abb.4: Einfluß der 4-Hydroxyphenylessigsäure-Konzentration auf die fluorimetrische Methode

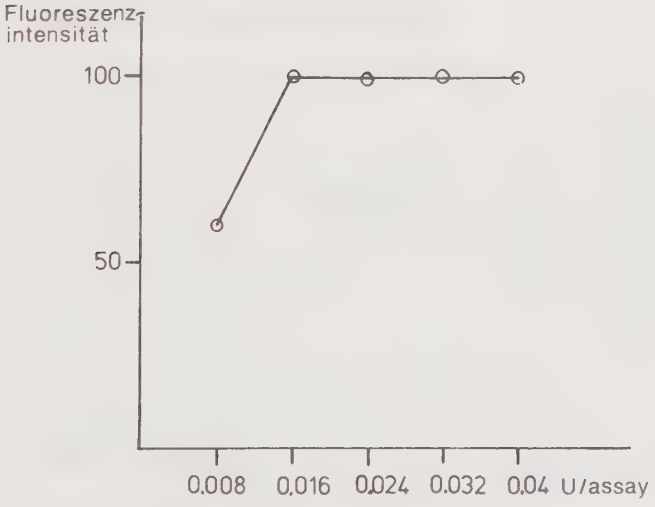


Abb.5: Einfluß der Cholesteroloxidase-Aktivität auf die fluorimetrische Methode

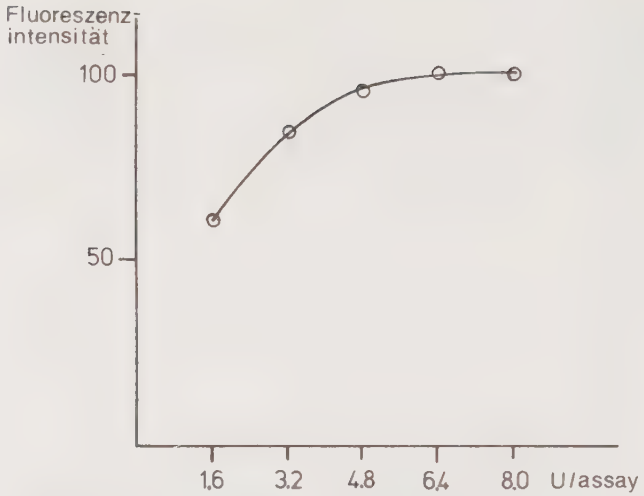


Abb.6: Einfluß der Peroxidase auf die fluorimetrische Methode

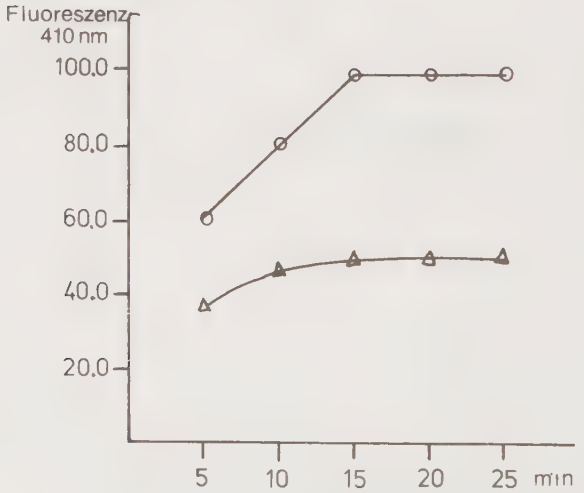


Abb.7: Kinetik der Reaktion mit Cholesterol-Standard Lösungen
(o——o) 10,34 mmol/l ≙ 400 mg/100 ml
(Δ——Δ) 5,17 mmol/l ≙ 200 mg/100 ml

Methode

Arbeitsvorschrift S. 66
Die Serumprobe wird in einem Reagenzglas mit Cholesterolesterase, Cholesteroloxidase, Triton X-100, Peroxidase, 4-Hydroxyphenyl-essigsäure und dem Phosphatpuffer (pH 8,0) 15 min auf 37°C erwärmt und die Fluoreszenz bei λ 410 nm (λ_{ex} = 315 nm) gemessen.

(2) Prüfung der Methode

• Linearität

- Eichgerade für Standard-Cholesterollösungen

Abb.8 zeigt die Eichkurve mit Standard-Cholesterollösungen. Unter den Testbedingungen besteht direkte Linearität zwischen Fluoreszenz und Cholesterolkonzentration im Meßbereich zwischen 1,29 - 10,34 mmol/l (≙ 50 - 400 mg/100 ml).

- Eichgerade mit Albuminzusatz

Die Serumalbuminkonzentration wird mit 3,8 - 4,6 g/100 ml (≙ 0,57 - 0,69 µmol/l) angegeben[1)], das entspricht einem Mittelwert von 4,2 g/100 ml (≙ 0,627 µmol/l). Diese Albuminmenge sollte den Cholesterollösungen zugesetzt werden zur Erstellung einer Eichgerade mit künstlichem Serum (Arbeitsvorschrift S.67). Unter den Testbedingungen verläuft die Eichgerade linear bis zu einer Cholesterolkonzentration von 10,34 mmol/l (≙ 400 mg/100 ml) (Abb.9).

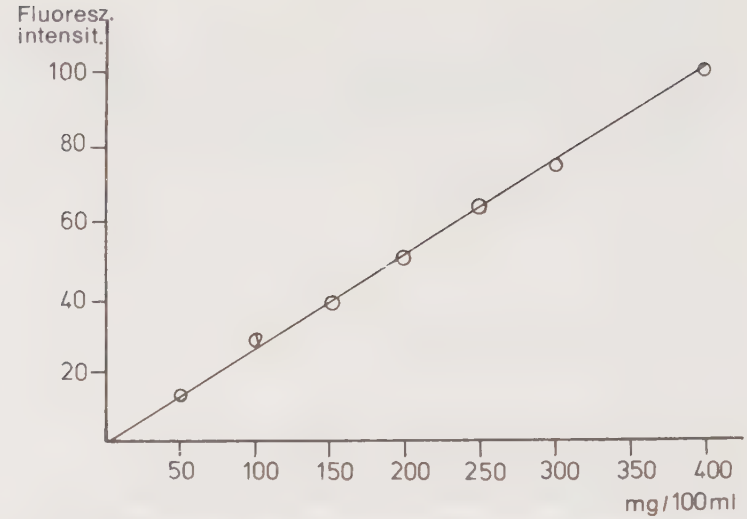


Abb.8: Eichgerade von Cholesterol-Standardlösungen mit der fluorimetrischen Methode

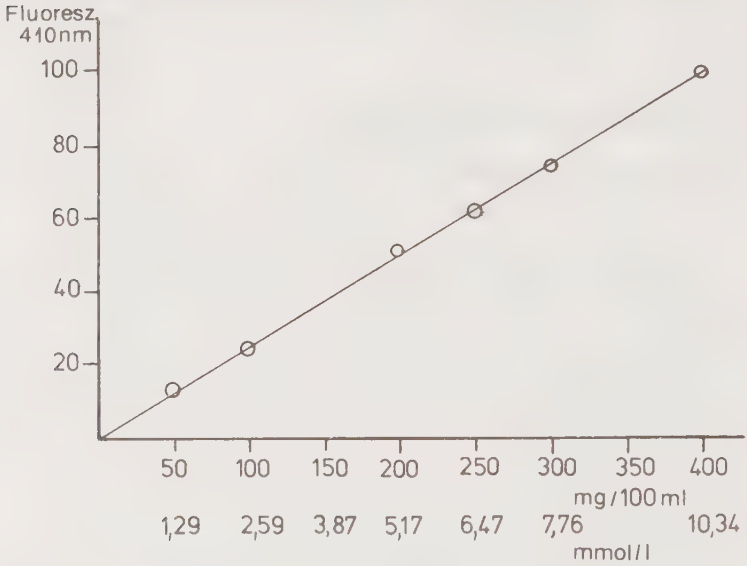


Abb.9: Eichgerade mit Albuminzusatz

- Wiederfindung von Standardcholesterollösungen

In verschiedenen Cholesterolstandardlösungen wurde das Cholesterol quantitativ mit dem fluorimetrischen enzymatischen Test wiedergefunden. Das Ergebnis der Wiederfindung nach Zusatz bekannter Mengen reinen Cholesterols ist in Tab.17 (S. 68) zusammengestellt. Die Wiederfindungsrate beträgt 100,3 $\pm$ 0,9.

- Richtigkeit

Zur Sicherung der Qualität der Ergebnisse quantitativer Bestimmungsmethoden muß im klinisch-chemischen Laboratorium entsprechend den Richtlinien der Bundesärztekammer[36] eine kontinuierliche Kontrolle der Richtigkeit durchgeführt werden. Die Richtigkeit einer Methode gibt an, um wieviel ein einzelner Meßwert von der tatsächlich im Untersuchungsmaterial vorliegenden Menge abweicht. Sie ist die Kenngröße für den systematischen Fehler.
Für die Beurteilung der Richtigkeit gibt es drei Methoden[1]:

a) Zusatzversuche
b) Mischversuche
c) Vergleichsversuche

a) Zusatzversuche

Serumproben von bekanntem Gehalt werden je 50, 100 und 200 mg/100 ml Cholesterol zugesetzt. Das Volumen der zugesetzten Cholesterollösungen wurde von der Pufferlösung abgezogen, so daß das Gesamtvolumen eines Reaktionsansatzes unverändert und konstant blieb. Die in der Tab.18 (S.69) aufgeführten Cholesterolwerte stammen aus je drei Bestimmungen; die Wiederfindungsrate beträgt 99,7%.

b) Mischversuche

Seren verschiedener Cholesterolkonzentrationen werden miteinander gemischt. Es sind jeweils die Mittelwerte aus drei Messungen angegeben (Tab.19, S. 69). Die Wiederfindungsrate beträgt 99,8%.

c) Vergleichsversuche

Vergleich des neuen Tests mit anderen enzymatischen Verfahren: Tab.6 (S. 57) zeigt den Vergleich von Probenvolumen, Reaktionszeit, Meßwellenlänge, Cholesteroloxidase-Mengen, ε -Werte und Präzision sowie die Variationskoeffizienten in Serie und von Tag zu Tag.

- Präzision

Die Präzision gilt als wichtiges Kriterium für die Zuverlässigkeit einer quantitativen Bestimmungsmethode. Sie ist die Kenngröße der zufälligen Fehler[1)]. Diese sind dafür verantwortlich, daß bei wiederholter Bestimmung derselben Analysen trotz gleichbleibender Konzentration keine übereinstimmenden Ergebnisse erzielt werden. Nach den Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätskontrolle[36)] ist eine ausreichende Präzision dann gegeben, wenn die relative Standardabweichung (Variationskoeffizient) 5% nicht überschreitet.
In der Praxis sind folgende Präzisionskontrollen üblich:

- Bestimmung der Präzision in Serie
- Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag

- Präzision in der Serie

n Bestimmungen eines Serums von bekanntem Gehalt wurden an einem Tag hintereinander durchgeführt.

Tab.1: Bestimmung der Präzision in Serie

Cholesterol mg/100 ml	Cholesterol mmol/l	n	S (mg)	S_{rel}=VK
107,0	2,77	12	1,67	1,56%
93,7	2,42	12	1,57	1,68%
160,4	4,15	8	3,00	1,87%

- Präzision von Tag zu Tag

Zur Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag wurde ein Serum in Portionen zu 100 µl eingeforen und bei -20°C gelagert. Täglich wurde eine Probe aufgetaut und der Untersuchung unterzogen.
Zahl der Bestimmungen: n = 20
Mittelwert: 107,3 mg Cholesterol/100 ml (≙ 2,77 mmol/l)
Standardabweichung: S = ± 2,66 mg Cholesterol (≙ ±0,069 mmol/l)
relative Standardabweichung: S_{rel} = VK = 2,48%.

Auswertung:
Die Präzision der Methode entspricht in beiden Punkten den Anforderungen.

• Empfindlichkeit und Nachweisgrenze

Bei einem Ansatz mit 0,01 ml Serum/Test entspricht eine Fluoreszenz von 48,9 bei 410 nm (λ_{ex}= 315 nm) einer Cholesterolkonzentration von 5,17 mmol/l (≙ 200 mg/100 ml).

Die Methode ist damit ausreichend empfindlich. Die Nachweisgrenze beträgt 0,005 mg Cholesterol/Test (1,29 mmol/l ≙ 50 mg/100 ml).

• Störanfälligkeit

Arbeitsvorschrift siehe S. 66
Künstliches Serum siehe S. 67

- Störung durch endogene Substanzen

Der fluorimetrische enzymatische Cholesteroltest wurde in Gegenwart von Kreatinin, Bilirubin, Harnsäure, Harnstoff, Glucose und Ascorbinsäure durchgeführt. Es wurden künstliche Seren aus Albumin, Cholesterollösung und Lösungen der zu testenden endogenen Substanzen hergestellt. Bilirubin wurde unter Zusatz von Natriumhydrogencarbonat in Lösung gebracht.

Ergebnis der Versuche:
Der Zusatz von Kreatinin bis zu 25 mg/100 ml hatte keinen Einfluß auf das Analysenergebnis. Relativ häufig ist mit erhöhten Blutzuckerwerten zu rechnen, wodurch keine Verfälschung bei der Bestimmung der Serumcholesterolkonzentration auftreten darf. Bei Zusatz von Glucose bis zu 1000 mg/100 ml konnten keine unterschiedlichen Resultate festgestellt werden. Ganz ähnliche Verhältnisse findet man beim Bilirubin. Bis zu einer Bilirubinkonzentration von 20 mg/100 ml wurde keine Beeinträchtigung der Richtigkeit registriert. Zak[37] hat beschrieben, daß Bilirubin wegen seiner Reaktion mit H_2O_2 in hoher Konzentration den enzymatischen Cholesteroltest beeinflußt. Wie in Tab.20 (S.71) dargestellt, führt auch der Zusatz von Harnsäure bis zu 25 mg/100 ml und von Harnstoff bis zu 100 mg/100 ml zu keiner Beeinflußung des Testergebnisses. Ein Gehalt von Ascorbinsäure bis zu 20 mg/100 ml stört ebenfalls nicht.

- Störung durch Pharmaka

In weiteren Versuchen wurde die Beeinflußung des fluorimetrischen enzymatischen Cholesteroltests durch Pharmaka geprüft. 38 häufig verwendete Präparate aus verschiedenen Indikationsgebieten wurden einem pharmakafreien Serum zugesetzt. Die Konzentration jedes Arzneistoffs entsprach der Tageseinzelmaximaldosis. Die Versuche ergaben, daß Pharmaka in den angegebenen Konzentrationen die enzymatische Bestimmung des Cholesterols nicht stören (Tab.21, S.72).

(3) Diskussion

Für die Bestimmung der oxidierenden Enzyme wurde 4-Hydroxyphenylessigsäure als Substrat benutzt[34]. In diesem Indikatorsystem oxidiert das entstehende H_2O_2 4-Hydroxyphenylessigsäure unter der katalytischen Wirkung von Peroxidase zu einem stark fluoreszierenden Produkt. Das Prinzip wurde auch zur Cholesterolbestimmung verwendet. Die beschriebene Methode erfaßt freies und verestertes Cholesterol. Die Reaktion ist empfindlich, und es entsteht ein einheitliches Kupplungsprodukt mit einem Fluoreszenzmaximum bei 410 nm (λ_{ex}= 315 nm). Unter den Testbedingungen kann man Cholesterol bis zu 10,34 mmol/l (≙ 400 mg/100 ml) bestimmen. Die neue Methode ist schnell und preisgünstig: Die maximale Fluoreszenz des Oxidationsproduktes wird bei 37°C innerhalb von 15 min erreicht. Andere Verfahren erfordern dagegen eine längere Inkubationszeit (Röschlau[10], 60 min bei 37°C). Für die quantitative Oxidation des Cholesterols in Lösungen reichen bis zur Konzentration von 10,34 mmol/l (≙ 400 mg/100 ml) 0,016 U Cholesteroloxidase pro Bestimmung aus. Bei anderen Methoden benötigt man größere Mengen dieses teuren Enzyms (F.Meiattini[28] 0,5 U/Test, Röschlau[10] 0,1 U/Test und Harders[14] 0,06 U/Test).

Ein gleichbehandelter Blindansatz ohne Zusatz von Cholesteroloxidase hat keine Fluoreszenz. Ein Vergleich mit der Trinder-Methode zeigt weitere Vorteile des neu entwickelten Tests: 4-Hydroxyphenylessigsäure, die als Fluorogen benutzt wird, ist billig, wasserlöslich und stabil. Das Oxidationsprodukt ist stabil und wasserlöslich. Im Gegensatz dazu ist Phenol, das bei der Trinder-Methode als Reagens benutzt wird, instabil, es unterliegt Luftoxidation, es denaturiert die Enzyme[28] und das Oxidationsfarbprodukt ist instabil[38]. 4-Hydroxyphenylessigsäure gilt als nicht cancerogen, andere Verfahren benutzen cancerogene Substanzen z.B.O-Dianisidin[39]. Die neue Methode ist empfindlich und spezifisch, denn endogene Substanzen (Kreatinin, Bilirubin, Glucose, Harnsäure, Harnstoff und Ascorbinsäure) und Pharmaka stören die enzymatische Bestimmung von Cholesterol nicht. Eine Beeinträchtigung der Richtigkeit der Methode durch die Gegenwart von Albumin (4,2 g/l ≙ 0,627 µmol/l) wurde nicht festgestellt. Die fluorimetrische Methode wurde mit dem als Standard-Referenz-Methode gebräuchlichen CHOD/PAP (Boehringer Mannheim), der Aldehyddehydrogenase-Methode und auch dem neu bearbeiteten enzymatischen Farbtest (S.24) verglichen (vg. S.43). Bei 82 Serumproben von Patienten wurde nach diesen Methoden die Cholesterolkonzentration ermittelt. Die Auswertung ergibt eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse. Die Korrelationskoeffizienten liegen zwischen 0,97024 und 0,98443 (n = 82).

Wenn kein Spektrofluorimeter zur Verfügung steht, kann man dieselbe Reaktion mit einem Spektrophotometer messen. Das Oxidationsprodukt absorbiert auch im UV-Bereich. Die Extinktionsintensität ist der Cholesterolkonzentration proportional und kann bei einer Wellenlänge von 242 nm gemessen werden (Abb.10). Unter diesen Testbedingungen besteht direkte Linearität zwischen Extinktion und Cholesterolkonzentration im Meßbereich zwischen 1,29 und 10,34 mmol/l (Abb.11). Die Wiederfindungsrate von zugesetzten Cholesterollösungen beträgt 99,6 ± 0,6% (Tab.23, S.73). Der Extinktionskoeffizient ist $\varepsilon_{242\ nm}$ = 19 434 l/mol·cm.

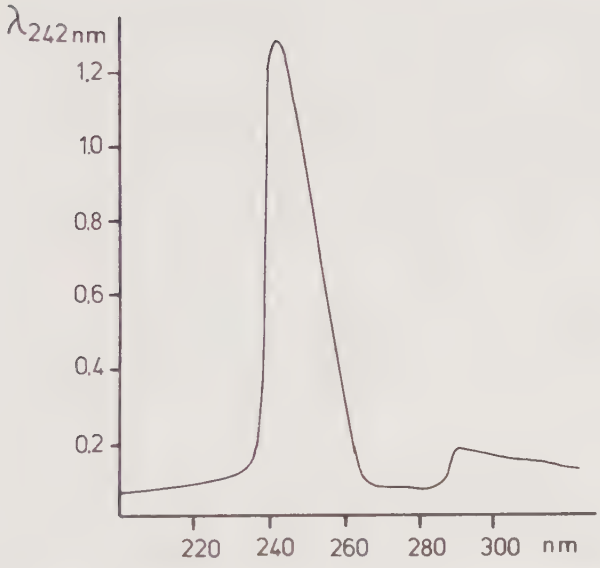


Abb.10: Absorptionskurve mit Cholesterol-Standardlösung (400 mg/100 ml ≙ 10,34 mmol/l) im UV-Bereich

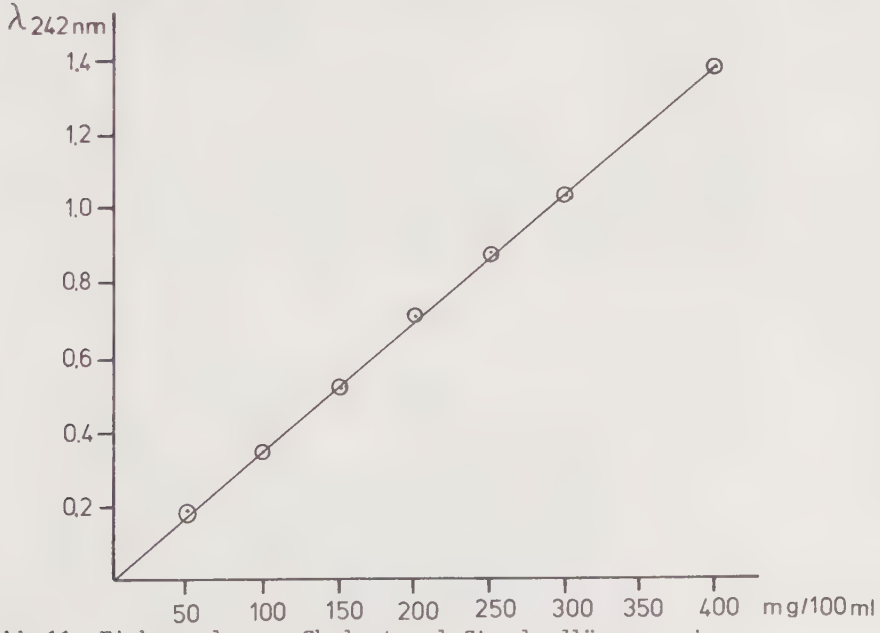
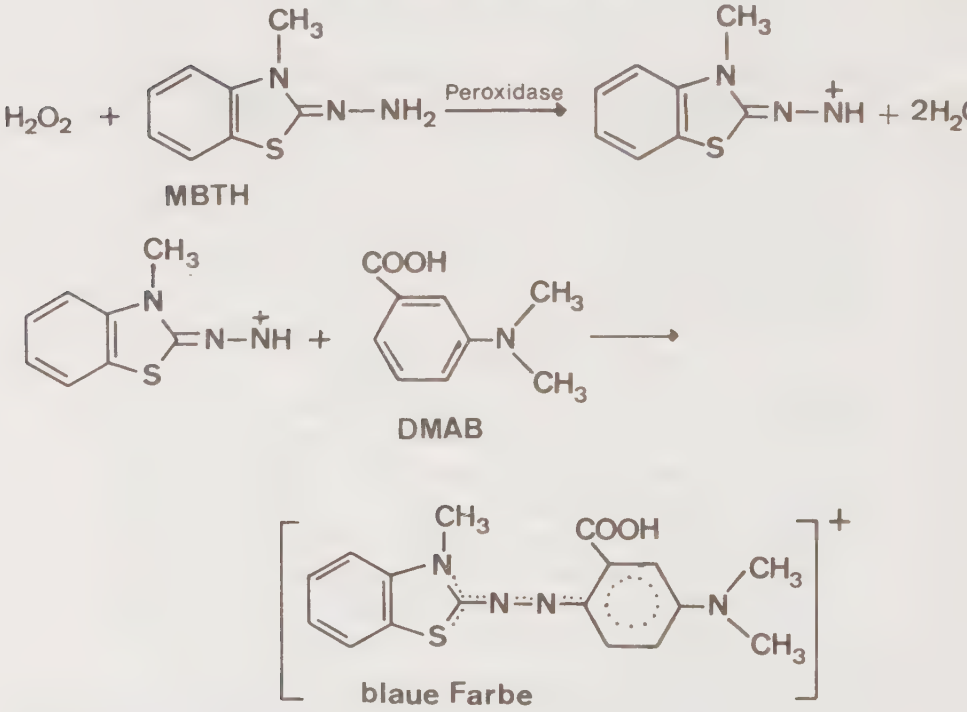


Abb.11: Eichgerade von Cholesterol-Standardlösungen im UV-Bereich

3. Umsetzung mit 3-Methyl-benzothiazolin-2-on-hydrazon/3-(Dimethylamino)-benzoesäure

Sawicki et al[40] beobachteten, daß einige aromatische Amine und Imino-heteroaromatische Substanzen in Gegenwart eines Oxidationsmittels z.B. Eisen(III)-chlorid zu einem kationischen Indamin-Farbstoff reagieren. Das Oxidationsprodukt hat eine intensive blaue Farbe. Ngo und Lenhoff[41] beschrieben eine Methode zur Bestimmung von Peroxidase durch Kupplung von 3-Methylbenzothiazolin-2-on-hydrazon mit 3-(Dimethylamino)-benzoesäure in Gegenwart von H_2O_2 zu einer intensiven blauen Farbe:



Dieselben Autoren verwendeten diese Reaktionen zur Bestimmung von H_2O_2 mit Peroxidase und von Glucose mit Glucoseoxidase. Dieses Prinzip wird nunmehr auf die Cholesterolbestimmung übertragen. Die Farbintensität ist der Cholesterolkonzentration proportional. Die Extinktionskurve zeigt ein Extinktionsmaxium bei 590 nm (Abb.12).

(1) Optimierung der Methode

Einfluß des Triton X-100:

Triton X-100 (Octylphenol-polyethylenglycol-ether) wurde als Lösungsvermittler für das freie Cholesterol verwendet[15]. Für eine maximale Reaktion von 10,34 mmol/l (≙ 400 mg/100 ml) Cholesterol sind 0,005 ml Triton X-100 pro Test ausreichend (Abb.13).

Einfluß der Cholesteroloxidase-Aktivität

Abb.14 zeigt den Reaktionsverlauf in Cholesterolstandardlösungen mit 5,17 mmol/l (≙ 200 mg/100 ml) und 10,34 mmol/l (≙ 400 mg/100 ml) in Gegenwart von verschiedenen Cholesteroloxidase-Mengen. Für die quantitative Oxidation des freien Cholesterols bis zu 10,34 mmol/l bei 37°C reichen 0,1 U Cholesteroloxidase pro Bestimmung aus.

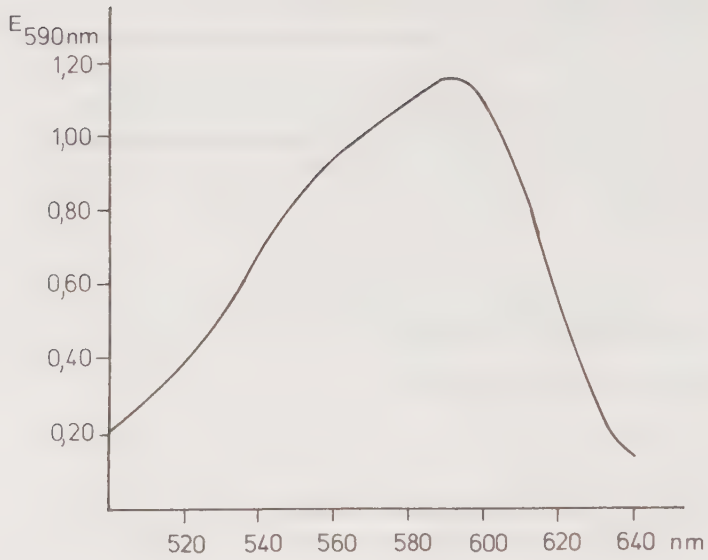


Abb.12: Absorptionskurve von Cholesterol mit dem Farbtest (Cholesterolkonzentration ist 300 mg/100 ml)

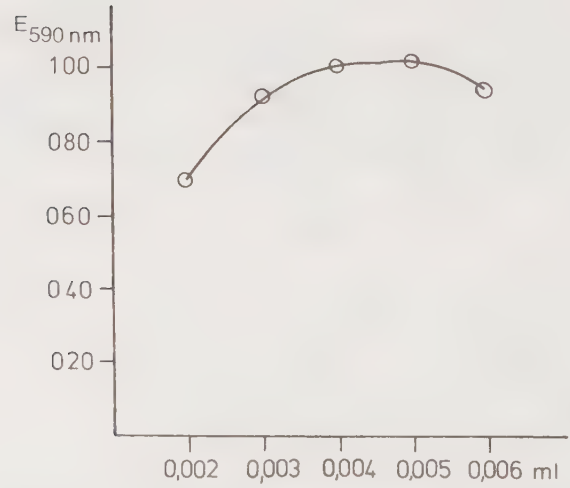


Abb.13: Optimale Konzentration von Triton X-100
Cholesterolkonzentration:
400 mg/100 ml ≙ 10,34 mmol/l

Einfluß der Peroxidase-Aktivität

Für die quantitative Kopplung von MBTH und DMAB durch H_2O_2 wird Peroxidase als Katalysator verwendet. Die maximale Kopplungsreaktion in Anwesenheit von 5,17 mmol/l (≙ 200 mg/100 ml) und 10,34 mmol/l (≙ 400 mg/100 ml) Cholesterol ist mit 7 U Peroxidase pro Bestimmung erreicht (Abb.15).

Einfluß des 3-Methyl-benzothiazolin-2-on-hydrazon (MBTH) und 3-(Dimethylamino)benzoesäure (DMAB)

In Gegenwart von H_2O_2 und unter der katalytischen Wirkung von Peroxidase reagieren die beiden farblosen Substanzen MBTH und DMAB unter Bildung einer intensiv blauen Färbung. Der Farbstoff hat eine breite Absorptionsbande zwischen 580 und 600 nm mit einem Maximum bei 590 nm. Für eine maximale Reaktion von 5,17 mmol/l (≙ 200 mg/100 ml) und 10,34 mmol/l (≙ 400 mg/100 ml) Cholesterol sind 0,60 µmol/l MBTH (Abb.16) und 18,2 µmol/l DMAB (Abb.17) pro Bestimmung ausreichend.

Methode

(s.Arbeitsvorschrift S.76)
In einem Reagenzglas werden Cholesterolesterase, Cholesteroloxidase, Trition X-100, Peroxidase, MBTH, DMAB und Phosphatpuffer pH 7,0 5 min auf 37°C temperiert. Dann fügt man die Serumprobe hinzu und erwärmt weitere 15 min bei 37°C. Aus der Extinktionsdifferenz zwischen dieser Probe und dem Probenleerwert (ohne Cholesteroloxidase) wird die Cholesterolkonzentration berechnet.

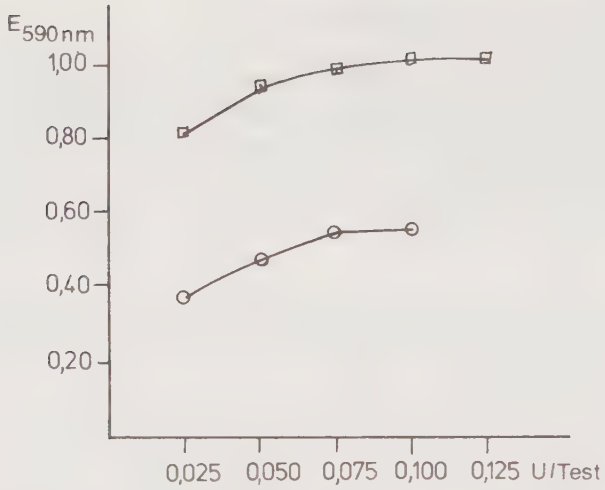


Abb.14: Cholesteroloxidase-Aktivität

Cholesterolkonzentration:
200 mg/100 ml ≙ 5,17 mmol/l und
400 mg/100 ml ≙ 10,34 mmol/l

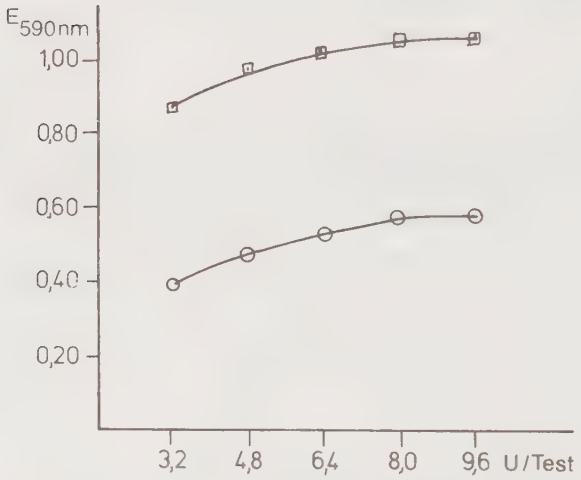


Abb.15: Einfluß der Peroxidase-Aktivität

Cholesterolkonzentration:
200 mg/100 ml ≙ 5,17 mmol/l und
400 mg/100 ml ≙ 10,34 mmol/l

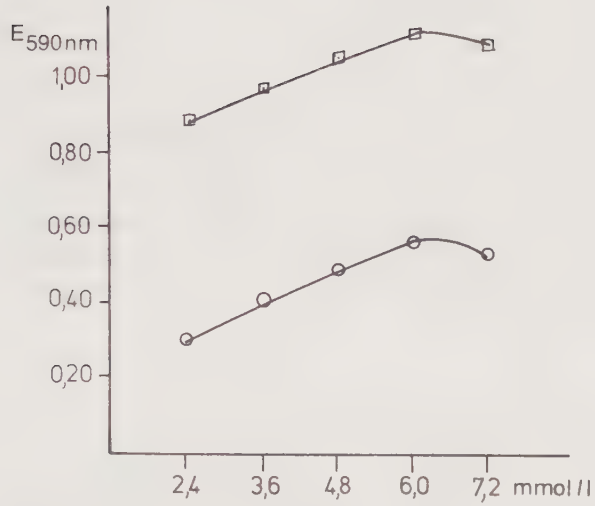


Abb.16: Einfluß der MBTH Konzentration

Cholesterolkonzentration:
200 mg/100 ml ≙ 5,17 mmol/l und
400 mg/100 ml ≙ 10,34 mmol/l

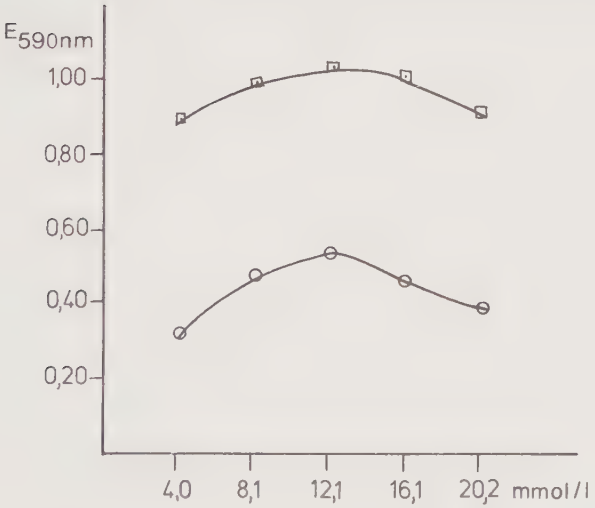


Abb.17: Optimale Konzentration von DMAB

Cholesterolkonzentration:
200 mg/100 ml ≙ 5,17 mmol/l und
400 mg/100 ml ≙ 10,34 mmol/l

(2) Prüfung der Methode

- Linearität

- Eichgerade für Standard-Cholesterollösungen

Abb.18 zeigt die Eichkurve mit Standard-Cholesterollösungen. Unter den Testbedingungen besteht direkte Linearität zwischen Extinktion und Cholesterolkonzentration im Meßbereich zwischen 0,645 - 10,34 mmol/l (≙25 - 400 mg/100 ml).

- Eichgerade mit Albuminzusatz

Die Serumalbuminkonzentration wird mit 3,8 - 4,6 g/100 ml (≙ 0,57 - 0,69 µmol/l) angegeben[1], das entspricht einem Mittelwert von 4,2 g/100 ml (≙ 0,627 µmol/l). Diese Albuminmenge sollte den Cholesterollösungen zugesetzt werden zur Erstellung einer Eichgerade mit künstlichem Serum (S. 67). Unter den Testbedingungen verläuft die Eichgerade linear bis zu einer Cholesterolkonzentration von 10,34 mmol/l (≙ 400 mg/100 ml) (Abb.19).

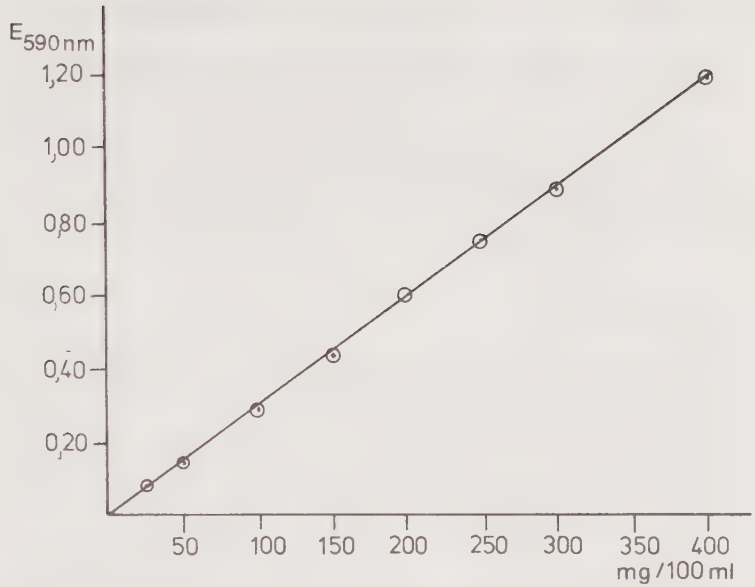


Abb.18: Eichgerade mit Standard-Cholesterollösungen

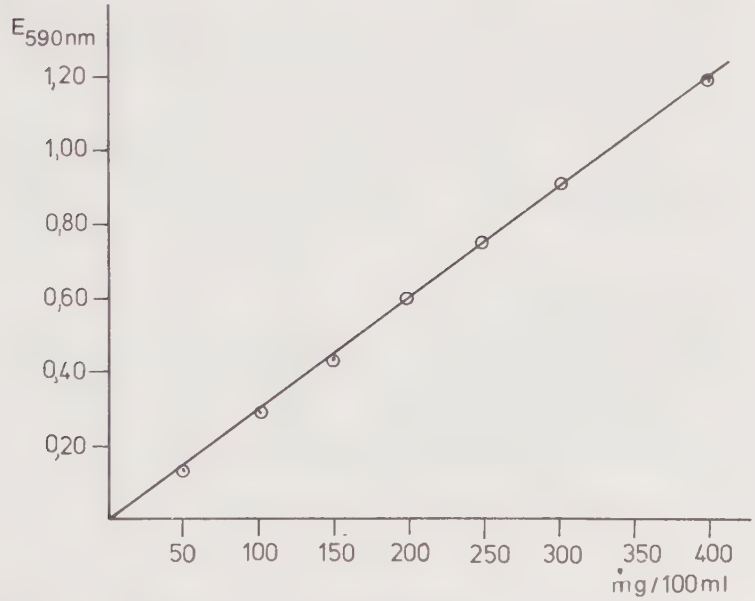


Abb.19: Eichgerade mit Albuminzusatz

- Wiederfindung von Standard-Cholesterollösungen

In verschiedenen Cholesterol-Standardlösungen wurde das Cholesterol quantitativ mit dem kolorimetrischen enzymatischen Test wiedergefunden. Das Ergebnis der Wiederfindung nach Zusatz bekannter Mengen reinen Cholesterols ist in Tab.33 (S. 78) zusammengestellt. Die Wiederfindungsrate beträgt 100,1 ± 0,8.

• Richtigkeit

Für die Beurteilung der Richtigkeit gibt es drei Methoden[1]:

a) Zusatzversuche
b) Mischversuche
c) Vergleichsversuche

a) Zusatzversuche

Serumproben von bekanntem Gehalt je 50, 100 und 200 mg/100 ml Cholesterol zugesetzt. Das Volumen der zugesetzten Cholesterollösung wurde vom Volumen der Pufferlösung abgezogen, so daß das Gesamtvolumen eines Reaktionsansatzes unverändert blieb. Die in der Tab.34 (S.79) aufgeführten Cholesterolwerte sind Mittelwerte aus je drei Bestimmungen; die Wiederfindungsrate beträgt 100,1%.

b) Mischversuche

Seren verschiedener Cholesterolkonzentrationen werden miteinander gemischt. Es sind jeweils die Mittelwerte aus drei Messungen angegeben (Tab.35, S.79). Die Wiederfindungsrate beträgt 100,1%.

c) Vergleichsversuche

Vergleich des neuen Tests mit anderen enzymatischen Verfahren:
Tab.6 (S. 57) zeigt den Vergleich von Probenvolumen, Reaktionszeit, Meßwellenlänge, Cholesteroloxidase-Mengen, ε -Werte und Präzision sowie die Variationskoeffizienten in Serie und von Tag zu Tag.

- Präzision

In der Praxis sind folgende Präzisionskontrollen üblich:

- Bestimmung der Präzision in Serie
- Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag.

- Präzision in Serie

n Bestimmungen eines Serums von bekanntem Gehalt wurden an einem Tag hintereinander durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab.2 zusammengefaßt.

Tab.2: Bestimmung der Präzision in Serie

Cholesterol mg/100 ml	Cholesterol mmol/l	n	S (mg)	S_{rel} = VK
104	2,69	12	1,51	1,45%
100	2,60	9	1,88	1,88%
155	4,00	11	2,54	1,64%

- Präzision von Tag zu Tag

Zur Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag wurde ein Serum in Portionen zu 100 µl eingefroren und bei -20°C gelagert. Täglich wurde eine Probe aufgetaut und der Untersuchung unterzogen.
Zahl der Bestimmungen: n = 20
Mittelwert: 103,1 mg Cholesterol/100 ml (≙ 2,67 mmol/l)
Standardabweichung: $S = \pm 2{,}42$ mg Cholesterol
($\triangleq \pm 0{,}063$ mmol/l)
relative Standardabweichung: $S_{rel} = VK = 2{,}35\%$

Auswertung:
Die Präzision der Methode entspricht in beiden Punkten den Anforderungen der Bundesärztekammer[36].

- Empfindlichkeit und Nachweisgrenze

Bei einem Ansatz mit 0,01 ml Serum/Test entspricht eine Extinktion von 0,594 bei 590 nm einer Cholesterolkonzentration von 5,17 mmol/l (≙ 200 mg/100 ml). Die Methode ist damit ausreichend empfindlich. Die Nachweisgrenze beträgt 0,0025 mg Cholesterol/Test (0,65 mmol/l ≙ 25 mg/100 ml).

- Störanfälligkeit

Arbeitsvorschrift siehe S.76
Herstellung von künstlichem Serum siehe S.67

- Störung durch endogene Substanzen

Die kolorimetrische Methode wurde in Gegenwart von Kreatinin, Bilirubin, Harnsäure, Harnstoff, Glucose und Ascorbinsäure durchgeführt. Es wurden künstliche Seren aus Albumin, Cholesterollösung und Lösungen der

zu testenden endogenen Substanzen hergestellt. Bilirubin wurde unter Zusatz von Natriumhydrogencarbonat in Lösung gebracht.

Ergebnis der Versuche:
Der Zusatz von Kreatinin bis zu 25 mg/100 ml sowie von Glucose bis zu 1000 mg/100 ml hatte ebenfalls keinen Einfluß auf das Analysenergebnis. Ganz ähnliche Verhältnisse findet man beim Bilirubin. Bis zu einer Bilirubinkonzentration von 20 mg/100 ml wurde keine Beeinträchtigung der Richtigkeit registriert. Zak[37] hat beschrieben, daß Bilirubin wegen seiner Reaktion mit H_2O_2 in hoher Konzentration den enzymatischen Cholesteroltest beeinflußt. Wie in Tab.36 (S. 81) dargestellt, führt auch der Zusatz von Harnsäure bis zu 25 mg/100 ml und von Harnstoff bis zu 100 mg/100 ml zu keiner Beeinflußung des Testergebnisses. Der Zusatz von Ascorbinsäure bis zu 20 mg/100 ml hat keinen Einfluß auf das Analysenergebnis.

- Störung durch Pharmaka

In weiteren Versuchen wurde die Beeinflussung des kolorimetrischen enzymatischen Cholesteroltests durch Pharmaka geprüft. 33 häufig verwendete Präparate aus verschiedenen Indikationsgebieten wurden einem pharmakafreien Serum zugesetzt. Die Konzentration jedes Arzneistoffes entsprach der Tageseinzelmaximaldosis. Die Versuche ergaben, daß die zugesetzten Pharmaka in den angegebenen Konzentrationen die enzymatische Bestimmung des Cholesterols nicht stören (Tab.37, S.82).

(3) Diskussion

Diese Methode wird für die Bestimmung von Peroxidase und Peroxidasekopplungsreaktionen verwendet[41]. In Verbindung mit enzymatischen Verfahren wird diese Methode für Cholesterolbestimmungen im Serum benutzt. Das Prinzip dieser Verfahren beruht auf einer oxidativen Kopplung von 3-Methyl-benzothiazolin-2-on-hydrazon (MBTH) mit 3-(Dimethylamino)-benzoesäure (DMAB) in Gegenwart von H_2O_2. Unter der katalytischen Wirkung von Peroxidase geben H_2O_2, MBTH und DMAB eine intensive blaue Farbe. Die Reaktion ist empfindlich, und es entsteht ein einheitliches Kopplungsprodukt mit einem Absorptionsmaximum bei 590 nm. Der molare Extinktionskoeffizient beträgt 33 000 l/mol·cm. Die Lösung von MBTH in Phosphatpuffer zeigt ein Absorptionsmaximum bei 285 nm mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von 5160 l/mol·cm. Auch die Lösung von DMAB hat ein Maximum bei 305 nm mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von 1430 l/mol·cm. Im Meßbereich über 380 nm absorbieren weder MBTH noch DMAB. Deswegen beeinträchtigen diese Reagenzien das Absorptionsmaximum des Kopplungsfarbproduktes nicht. Ein Blindansatz ohne Zusatz von Peroxidase oder in Abwesenheit von H_2O_2 (ohne Zusatz von Cholesteroloxidase) zeigt eine sehr schwache Färbung bei 590 nm. Die Reagenzien sind mindestens 2 Monate bei 4^oC stabil. MBTH und DMAB sind wasserlöslich. MBTH- und DMAB-Lösungen in Phosphatpuffer pH 7,0 lassen sich problemlos herstellen. Das enzymatische Oxidationsprodukt von MBTH und DMAB ist einheitlich, stabil und wasserlöslich. Im Gegensatz dazu ist Phenol, das bei der Trinder-Methode benutzt wird, instabil, wasserunlöslich, es unterliegt der Luftoxidation, es denaturiert die Enzyme und das Oxidationsprodukt ist ebenfalls instabil[38]. In einer Modifikation der Trinder-Methode wurde versucht, die Empfindlichkeit zu steigern[12,42].

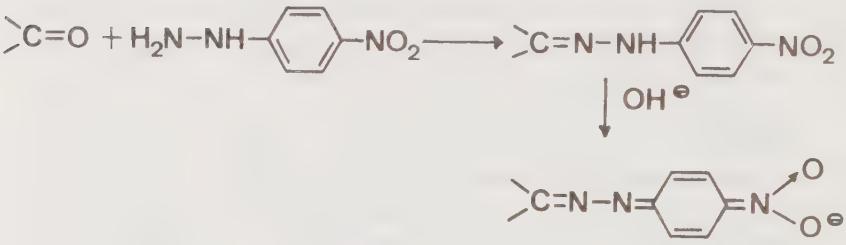
Dabei wurde das Phenol durch substituierte Derivate ersetzt. Das Problem, diese Stoffe in Lösung zu bringen, bleibt. 2,4- und 2,5-Dichlorphenol sind unlöslich in Wasser. Die Stabilität der 2,4- und 2,5-Dichlorphenol-Farbstoffe ist jedoch ähnlich der des Phenol-Farbstoffs. In einer anderen Verbesserung der Trinder-Methode wurde Dimethylanilin statt Phenol benutzt[43]. Dieses System ist empfindlich und stabil, aber Dimethylanilin ist toxisch und wasserunlöslich. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Methode ist empfindlich und schnell. Die maximale Absorption des Oxidationsprodukts wird bei 37°C innerhalb von 20 min erreicht. Andere Verfahren erfordern dagegen eine längere Inkubationszeit (Röschlau[10], 60 min bei 37°C).

MBTH und DMAB sind nicht cancerogen, andere Methoden verwenden cancerogene Substanzen z.B. O-Dianisidin[39]. Die beschriebene Methode erfaßt freies und verestertes Cholesterol. Unter den Testbedingungen kann man Cholesterol bis zu 10,34 mmol/l bestimmen. Die Nachweisgrenze beträgt 0,0025 mg Cholesterol/Test (0,65 mmol/l ≙ 25 mg/100 ml). Die Methode ist spezifisch, denn endogene Substanzen (Kreatinin, Bilirubin, Glucose, Harnsäure, Harnstoff und Ascorbinsäure) und Pharmaka stören die enzymatische Cholesterolbestimmung nicht. Eine Beeinträchtigung der Richtigkeit der Methode durch die Gegenwart von Albumin (4,2 g/l ≙ 0,627 µmol/l) wurde nicht festgestellt.

Bei der Bestimmung der Cholesterolwerte von 82 Serumproben von Patienten mit diesem neuen enzymatischen Farbtest, sowie dem als Standard-Referenz-Methode CHOD/PAP (Boehringer Mannheim), der Aldehyddehydrogenase Methode und auch der neu bearbeiteten fluorimetrischen Methode bestand eine gute Übereinstimmung. Die Korrelationskoeffizienten liegen zwischen 0,97644 und 0,99505 (vgl. S. 43).

4. Umsetzung mit 4-Nitrophenylhydrazin

Das freie Cholesterol wird in Gegenwart von Sauerstoff und Cholesteroloxidase in Δ^4-Cholestenon und H_2O_2 umgewandelt. Zur Ermittlung des freien Cholesterols wird das gebildete Δ^4-Cholestenon nach folgendem Schema bestimmt:



Δ^4-Cholestenon soll wie alle anderen Δ^4-3-Ketosteroide[44] mit 4-Nitrophenylhydrazin bestimmt werden. Dieses Reagens haben T.Nishina und M.Kimura[45] benutzt, um Cholesterol im Serum zu messen, nachdem sie dieses zuvor mit Kiliani-Reagens zum Cholest-4-en-3,6-dion oxidiert haben. Δ^4-Cholestenon bildet mit 4-Nitrophenylhydrazin ein gelbes 4-Nitrophenylhydrazon, das nach Alkalizusatz eine rote Färbung annimmt. Dimethylformamid beeinflußt dabei die Farbentwicklung und Stabilität günstig[46].

(1) Methode

(Arbeitsvorschrift S. 83)

Die Probe wird in einem Reagensglas mit Cholesteroloxidase, Triton X-100 und Phosphatpuffer (pH 7,0) 10 min auf 37°C erwärmt, das Reagens unter Methanolzusatz hinzugegeben und weitere 40 min bei 50°C temperiert. Nach dem

Abkühlen setzt man Dimethylformamid und Natronlauge (1 molar) zu. Aus der Extinktionsdifferenz zwischen dieser Probe und dem Probenleerwert (ohne Cholesteroloxidase) wird die Cholesterolkonzentration berechnet.

(2) Ergebnisse

Für die quantitative Oxidation des freien Cholesterols sind 0,05 U Cholesteroloxidase pro Bestimmung ausreichend. Das Maximum dieser enzymatischen Reaktion wird bei 37°C in 10 min erreicht. Die Umsetzung mit 4-Nitrophenylhydrazin wird mit Standardlösungen von Cholestenon geprüft. Die Absorptionskurve des Farbstoffes zeigt ein Maximum bei 540 nm (Abb.20). Abb.21 zeigt den Reaktionsverlauf in Cholestenonstandardlösungen bei 50°C und 60°C. Das Maximum der Farbentwicklung wird bei 50°C in 40 min erreicht. Danach ist der Farbstoff für weitere 120 min stabil (Abb.22). In weiteren Versuchen sollte die Eignung der Methode für die Cholesterolbestimmungen im Serum geprüft werden. Da viele Bestandteile des Serums über Ketofunktionen verfügen und ebenfalls mit 4-Nitrophenylhydrazin reagieren, wurde die Bestimmung gestört. Die Eichgerade verläuft nicht linear, so daß eine quantitative Auswertung von Messungen im Serum nach diesem Verfahren nicht möglich ist. Deswegen wurde dieser Test in den Methodenvergleich nicht einbezogen.

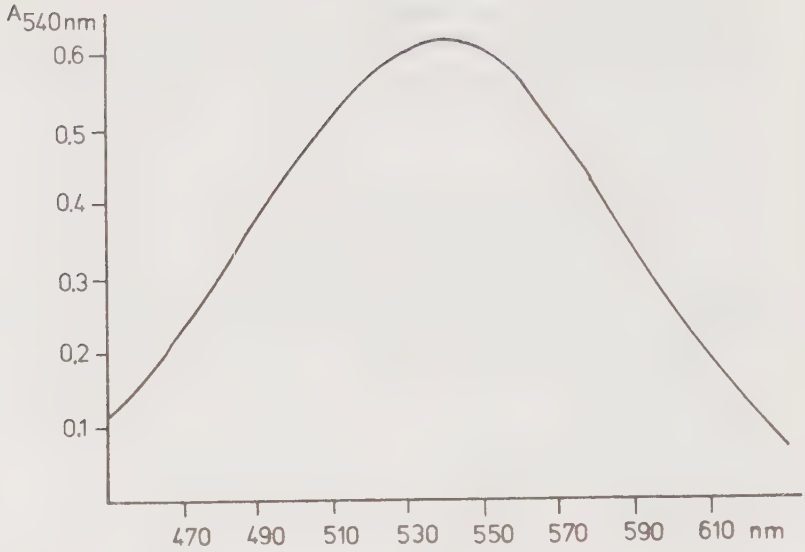


Abb.20: Absorptionskurve einer Standard-Cholestenon-lösung mit dem Farbtest

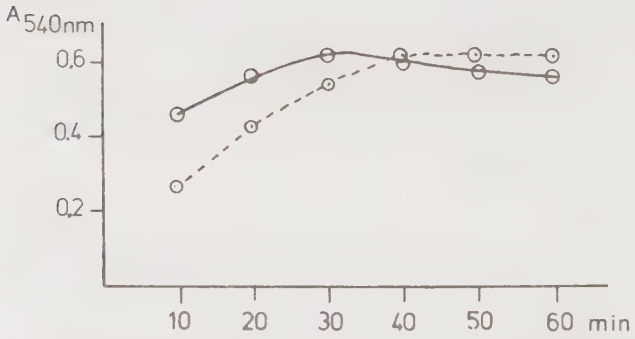


Abb.21: Kinetik der Farbreaktion mit Cholestenon-Standardlösungen
bei 60°C (——) und 50°C (----)

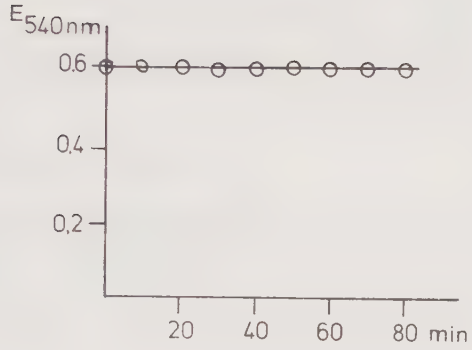


Abb.22: Farbstabilität mit Standard-Cholestenonlösungen

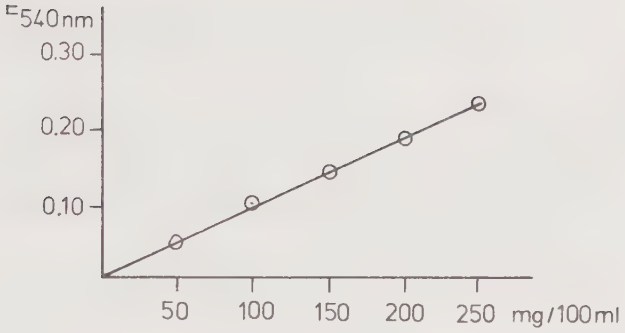


Abb.23: Eichgerade mit Standard-Cholesterollösungen

- Linearität

Unter den Testbedingungen besteht direkte Linearität zwischen Farbintensität und Cholesterolkonzentration im Meßbereich zwischen 1,29 und 6,47 mmol/l (≙ 50-250 mg/100 ml) (Abb.23). Der molare Extinktionskoeffizient beträgt 23 469 l/mol·cm.

- Richtigkeit

In verschiedenen Cholesterolstandardlösungen wurde das Cholesterol quantitativ mit dem kolorimetrischen enzymatischen Test wiedergefunden. Das Ergebnis der Wiederfindungen nach Zusatz bekannter Mengen reinen Cholesterols ist in Tab.40, S.84 zusammengestellt.
Die Wiederfindungsrate beträgt 99,8 $\pm$ 1,2%.

(3)Diskussion

Cholesteroloxidase oxidiert Cholesterol unter Sauerstoffverbrauch zu Δ^4-Cholestenon und H_2O_2. Für diese enzymatische Reaktion ist eine wäßrige Lösung (Phosphatpuffer, pH 7,0) günstig. Dagegen läuft die Reaktion zwischen 4-Nitrophenylhydrazin und dem gebildeten Δ^4-Cholestenon in methanolischer Lösung ab. Versuche ergaben, daß bei Kombination dieser Indikatorreaktion mit der enzymatischen Cholesterolreaktion die Empfindlichkeit verringert wird. Diese Schwierigkeit läßt sich umgehen, wenn die enzymatische Reaktion mit dem geringsten Volumen von Phosphatpuffer (0,025 ml) angesetzt wird. Nach Zusatz von Methanol wird dann die Farbreaktion mit 4-Nitrophenylhydrazin durchgeführt.
Der berechnete ε-Wert ist 23 469 l/mol·cm.

5. Statistischer Methodenvergleich

Zur Beurteilung der Richtigkeit einer Methode werden neben Zusatz- und Mischversuchen Vergleichsversuche herangezogen. Mindestens 50 Seren werden dabei
a) nach der zu prüfenden,
b) nach ein oder mehreren anderen, möglichst zuverlässigen Methoden untersucht und die Ergebnisse statistisch ausgewertet.

Die fluorimetrische Methode mit 4-Hydroxyphenylessigsäure (M1) und der Farbtest mit MBTH und DMAB (M2) wurden mit folgenden Methoden,bezeichnet als M3 und M4, verglichen.

M3 Aldehyddehydrogenase-Methode[13)]

(vgl. S.8)
Das gebildete H_2O_2 oxidiert Ethanol unter der Wirkung von Katalase zum Acetaldehyd. Acetaldehyd reagiert mit NAD in Anwesenheit von Aldehyddehydrogenase zu Acetat und NADH. Die Extinktion wird bei 334 oder 340 nm gemessen.

M4 CHOD/PAP-Methode (Boehringer Mannheim)[11,12)]

(vgl. S.7)
H_2O_2 oxidiert 4-Aminophenazon und Phenol unter der katalytischen Wirkung von Peroxidase zu einem 4-(p-Benzochinonmonoimino)-phenazon. Die Farbintensität kann zwischen 500 -550 nm gemessen werden.

Verwendet wurden Patientenseren, die eingefroren, bei - 25°C gelagert und unmittelbar vor Durchführung der Analysen wieder aufgetaut worden sind. Die Bestimmungen nach M4 wurden im Zentrum für Laboratoriumsmedizin der Medizinischen Hochschule Hannover, Abteilung IV (klinische Chemie II), Zentrallabor im Krankenhaus Oststadt unter der Leitung von Dr.med. E.Henkel durchgeführt. Die Messungen der Methoden M1, M2 und M3 erfolgten im Pharmazeutischen Institut, Tübingen.

Angabe der Einzelergebnisse (Tab.41, S. 85)

M1 : Die fluorimetrische enzymatische Methode
M2 : Die kolorimetrische enzymatische Methode
M3, M4 : s.o.
alle Angaben in mmol/l

Stichprobenumfang

82 Seren

Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte im Rechenzentrum der Medizinischen Hochschule Hannover, Abteilung Biometrie.

Streuungsdiagramm

Ein Streuungsdiagramm oder Scattergramm veranschaulicht den Zusammenhang zwischen zwei Variablen. Für jedes Serum werden die nach M3 und M4 ermittelten Werte den nach M1 und M2 erhaltenen Ergebnissen gegenübergestellt und in einem zweidimensionalen Koordinatensystem ausgedruckt. Jedes Wertepaar wird im

Streuungsdiagramm durch ein Kreuz symbolisiert (+). Nehmen zwei oder mehrere Wertepaare die gleiche Position ein, so werden sie durch die entsprechenden arabischen Ziffern vertreten. Je enger die Punkte an einer gemeinsamen Geraden liegen, ein desto stärkerer Zusammenhang besteht zwischen beiden Variablen.

Zu jedem Scattergramm werden noch folgende Werte angegeben:

Pearson'scher Korrelationskoeffizient[47)]

Der Produktmoment-Korrelationskoeffizient r nach Bravais und Pearson ist eine Maßzahl für die Straffheit eines linearen Zusammenhanges zwischen zwei Variablen. Ist $r = 0$, so besteht kein linearer Zusammenhang. $r = 1$ bedeutet eine vollständige Übereinstimmung zwischen zwei Variablen. Alle Werte liegen auf einer Regressionsgeraden, sie weist keinerlei Streuung auf.

Bestimmtheitsmaß[47)]

Das Quadrat des Korrelationskoeffizienten wird als Bestimmtheitsmaß r^2 bezeichnet. r^2 ist ein Maß für die Abhängigkeit zweier Reihen von Variablen. Je geringer die Streuung der beobachteten Wertepaare um die Regressionsgerade ist, umso schärfer ist diese bestimmt, umso stärker ist die Abhängigkeit zwischen beiden Meßreihen, d.h. mit umso größerer Bestimmtheit läßt sich aus einem Wert x auf den zugehörigen Wert y schließen.

Gleichung der Regressionsgeraden[47)]

Besteht ein linearer Zusammenhang zwischen den Variablen, so streuen die Wertepaare um eine Gerade, die sog. Regressionsgerade.

Sie läßt sich durch die allgemeine Geradengleichung
$y = a + bx$ beschreiben.
a = Achsenabschnitt auf der Ordinate (intercept)
b = Steigung der Regressionsgeraden oder des Regressionskoeffizienten (slope)

Tab.3: Pearson'scher Korrelationskoeffizient r und Bestimmtheitsmaß r^2 von M2 - M4 in Bezug auf M1

Methode	r	r^2
M2	0,97644	0,95344
M3	0,98443	0,96910
M4	0,97024	0,94137

Tab.4: Pearson'scher Korrelationskoeffizient r und Bestimmtheitsmaß r^2 von M1, M3 und M4 in Bezug auf M2

Methode	r	r^2
M1	0,97644	0,95344
M3	0,99505	0,99012
M4	0,99043	0,98095

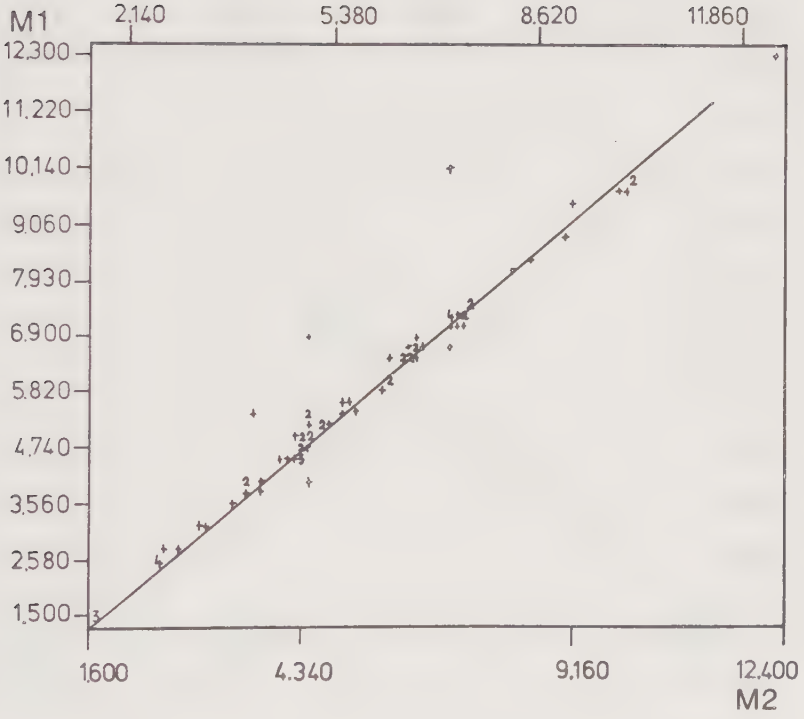


Abb.24: Scattergramm M1 - M2

Pearson'scher Korrelationskoeffizient	r = 0,97644
Bestimmtheitsmaß	r^2 = 0,95344
y-Achsenabschnitt	a = 0,16226
Steigung	b = 0,99283
Gleichung der Regressionsgeraden	y = 0,16226 + 0,99283x

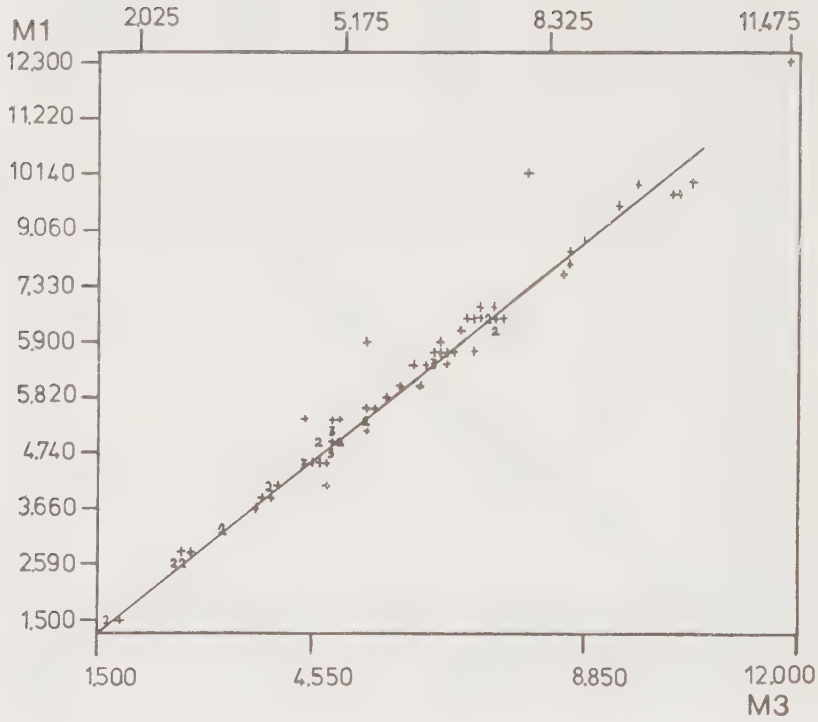


Abb.25: Scattergramm M1 - M3

Pearson'scher Korrelationskoeffizient	r = 0,98443
Bestimmtheitsmaß	r^2 = 0,96910
y-Achsenabschnitt	a = 0,11375
Steigung	b = 0,99764
Gleichung der Regressionsgeraden	y = 0,11375 + 0,99764x

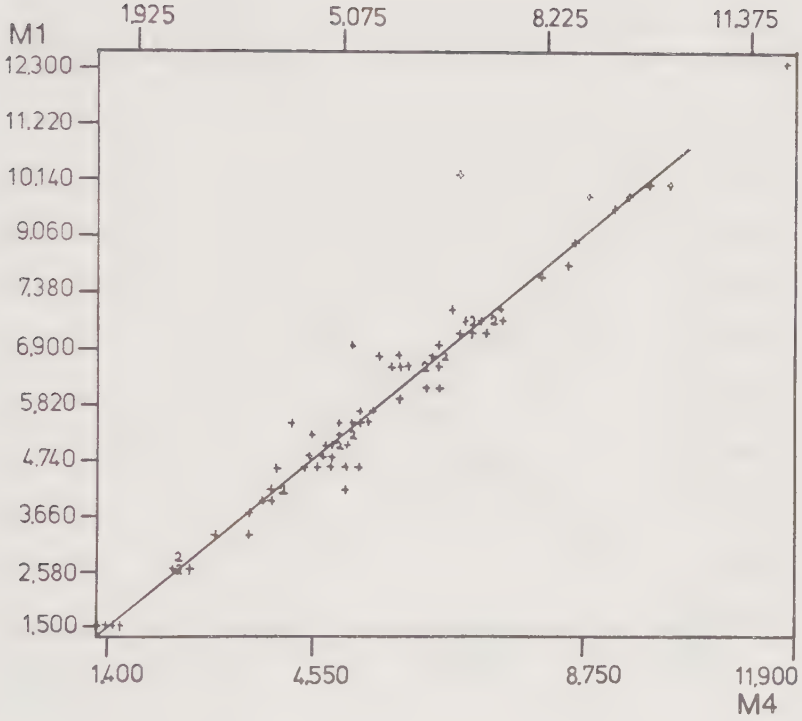


Abb.26: Scattergramm M1 - M4

Pearson'scher Korrelationskoeffizient	r = 0,97024
Bestimmtheitsmaß	r^2 = 0,94137
y-Achsenabschnitt	a = 0,10201
Steigung	b = 1,02856
Gleichung der Regressionsgeraden	y = 0,10201 + 1,02856x

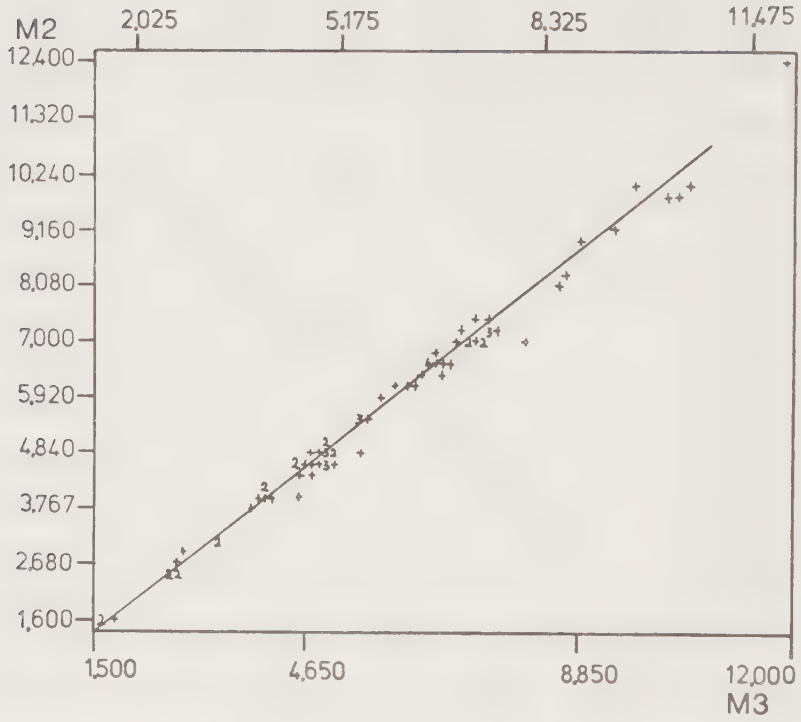


Abb.27: Scattergramm M2- M3

Pearson'scher Korrelationskoeffizient	$r = 0,99505$
Bestimmtheitsmaß	$r^2 = 0,99012$
y-Achsenabschnitt	$a = 0,02723$
Steigung	$b = 0,99175$
Gleichung der Regressiongeraden	$y = 0,02723 + 0,99175x$

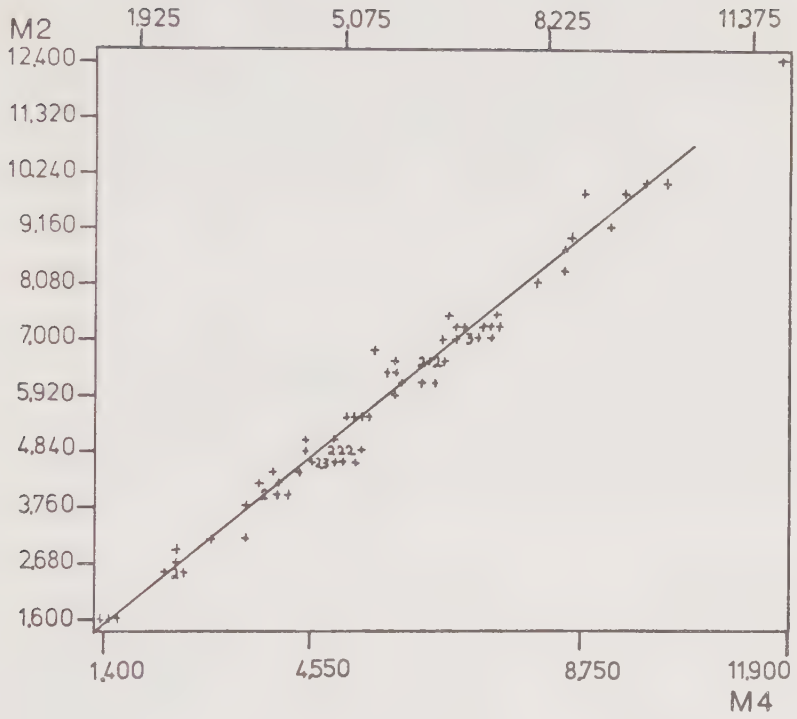


Abb.28: Scattergramm M2- M4

Pearson'scher Korrelationskoeffizient	$r = 0,99043$
Bestimmtheitsmaß	$r^2 = 0,98095$
y-Achsenabschnitt	$a = - 0,04170$
Steigung	$b = 1,03263$
Gleichung der Regressionsgeraden	$y = - 0,04170 + 1,03263x$

Zum Vergleich von Methoden sind noch folgende Daten von Bedeutung[47]:

Der Mittelwert (arithmetisches Mittel, engl. mean) ist die Summe aller Beobachtungen, geteilt durch die Anzahl aller Beobachtungen. Nur bei Normalverteilungen fällt der Mittelwert mit dem Kurvengipfel zusammen, bei schiefen eingipfeligen Verteilungen liegt das Maximum, also der größte Teil der Werte, rechts oder links vom Mittelwert. Zur Charakterisierung solcher Verteilungen wird der Median (Zentralwert, Halbwert) herangezogen. Er ist derjenige beobachtete Wert in der nach Größe der Einzelwerte geordneten Reihe, der die Reihe halbiert. Im Gegensatz zum arithmetischen Mittel bleibt der Median von Extremwerten unbeeinflußt.
Die Spannweite (Variationsbreite, engl. range) ist die Differenz zwischen dem größten (Maximum) und dem kleinsten Wert (Minimum) innerhalb einer Stichprobe. Dieses Streuungsmaß berücksichtigt aber nur die Extremwerte einer Reihe, über die Lage und Verteilung der mittleren Werte wird nichts ausgesagt.

Tab.5: Gegenüberstellung der statistischen Daten

Methode	Mittelwert (mmol/l)	Median (mmol/l)	Spannweite (mmol/l)	Minimun (mmol/l)	Maximum (mmol/l)
M1	5,9	5,7	10,8	1,5	12,3
M2	5,8	5,5	10,8	1,6	12,4
M3	5,8	5,5	10,5	1,5	12,0
M4	5,7	5,3	10,5	1,4	11,9

Der Auswertung liegen die Ergebnisse von 82 Proben zugrunde.

Die Ergebnisse zeigen, daß die fluorimetrische Methode M1 und die kolorimetrische Methode M2 miteinander und auch mit anderen Vergleichsmethoden korrelieren. Aus der Tabelle S.46 sowie den Scattergrammen ist ersichtlich, daß die Übereinstimmung umso besser ist, je spezifischer die jeweilige Vergleichsmethode ist.
Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Ergebnisse der Vergleichsversuche für die Richtigkeit der zu prüfenden Methoden sprechen.

III. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Methoden für die enzymatische Cholesterolbestimmung in Seren ausgearbeitet, welche die Spezifität eines enzymatischen Verfahrens mit der Empfindlichkeit und Genauigkeit von Fluoreszenz- bzw. Farbreaktionen koppelt. Die herangezogene Reaktion beruht auf der bekannten Spaltung von Cholesterolestern durch Cholesterolesterase in freies Cholesterol und Fettsäuren. Das freie Cholesterol wird in Gegenwart von Sauerstoff und Cholesteroloxidase zu Δ^4-Cholestenon und Wasserstoffperoxid oxidiert. Zur Ermittlung des Cholesterolgehalts empfiehlt sich die Messung sowohl des Wasserstoffperoxids als auch des Δ^4-Cholestenons. Wasserstoffperoxid wurde über eine fluorimetrische und über eine kolorimetrische Methode, Δ^4-Cholestenon über das farbige p-Nitrophenylhydrazon bestimmt.
Zur fluorimetrischen Bestimmung wurde 4-Hydroxyphenylessigsäure in Gegenwart von Peroxidase verwendet, da es sich in Wasser gut löst, relativ preiswert ist und nach Oxidation eine hohe Fluoreszenzintensität aufweist. Der Einsatz von 4-Hydroxyphenylessigsäure geht auf Guilbault und Mitarb.[34,35] zurück, welche dieses Reagens auch zur Bestimmung von Monoamin- und Diaminoxidase einsetzten. Die Fluoreszenzintensität ist der Cholesterolkonzentration proportional und kann bei einer Wellenlänge von 410 nm (λ_{fl}) und einer Anregungswellenlänge von 315 nm (λ_{ex}) gemessen werden. Bei 37°C wird das Maximum der Reaktionsentwicklung nach 15 Minuten erreicht.
Zur kolorimetrischen Wasserstoffperoxidbestimmung wurde 3-Methyl-benzothiazolin-2-on-hydrazon und 3-(Dimethylamino)-benzoesäure eingesetzt, welche in Gegenwart von Peroxidase zu einem blauen Indamin-Farbstoff koppeln.

Diese Reagenzien wurden von Ngo und Lenhoff[41] zur Bestimmung des Wasserstoffperoxids mit Peroxidase und der Glucose mit Glucoseoxidase verwendet. Die Farbintensität wird bei einer Wellenlänge von 590 nm gemessen und ist der Wasserstoffperoxid- und damit der Cholesterolkonzentration proportional.
Die beiden Methoden wurden einer eingehenden klinischen Prüfung unterzogen. Die Eichgerade verläuft linear bis zu einer Cholesterolkonzentration von 400 mg/100 ml ≙ 10,34 mmol/l. Eine Beeinflußung der Meßergebnisse durch endogene Substanzen konnte nicht beobachtet werden. Glucose, Kreatinin, Harnsäure, Harnstoff, Bilirubin und Ascorbinsäure stören in den angegebenen Konzentrationen, jeweils einem mehrfachen ihrer Normalwerte im Serum, nicht. Das gleiche gilt auch für Pharmaka aus verschiedenen Indikationsgebieten.
Zur Beurteilung der Richtigkeit wurden Zusatz-, Misch- und Vergleichsversuche durchgeführt. Die Wiederfindungsrate nach der Zumischmethode in Seren mit bekanntem Cholesterolgehalt betrug 99,7 $\pm$ 0,4% bei der fluorimetrischen und 100 $\pm$ 0,9% bei der kolorimetrischen Methode, bei der Mischung dieser Seren untereinander 99,7 $\pm$ 0,8% (fluorimetrische Methode) und 100,3 $\pm$ 0,7% (kolorimetrische Methode).
Es wurden Vergleichsversuche mit zwei anderen Verfahren (Aldehyddehydrogenase-Methode und CHOD/PAP Boehringer Mannheim) durchgeführt und die Einzelergebnisse von 82 Seren einem statistischen Methodenvergleich unterzogen. Die Verteilung der nach jeweils einer Vergleichsmethode und der fluorimetrischen und kolorimetrischen Methode ermittelten Werte wurde in einem Streuungsdiagramm dargestellt und die berechnete und die ideale Regressionsgerade eingezeichnet.

An statistischen Daten wurden der Pearson'sche Korrelationskoeffizient und das Bestimmtheitsmaß zur Beurteilung des Zusammenhangs zweier Methoden sowie Mittelwert, Median, Spannweite, Minimum und Maximum für jede Methode angegeben. Die Auswertung ergab, daß die fluorimetrische Methode und die kolorimetrische Methode miteinander und mit anderen geprüften Verfahren korrelieren, die Korrelationskoeffizienten für die fluorimetrische Methode liegen zwischen 0,97024 und 0,98443, für die kolorimetrische Methode zwischen 0,97644 und 0,99505. Die Übereinstimmung ist umso besser, je spezifischer die jeweilige Vergleichsmethode ist.

Die Variationskoeffizienten bei der Bestimmung von Cholesterol betrugen

- o in Serie
  - fluorimetrische Methode
    1,56% ($\bar{x}$ = 107,0 mg/100 ml = 2,77 mmol/l; n = 12)
    1,68% ($\bar{x}$ = 93,8 mg/100 ml = 2,43 mmol/l; n = 12)
    1,87% ($\bar{x}$ = 160,4 mg/100 ml = 4,15 mmol/l; n = 8)
  - kolorimetrischer Methode
    1,45% ($\bar{x}$ = 104,4 mg/100 ml = 2,69 mmol/l; n = 12)
    1,88% ($\bar{x}$ = 100,0 mg/100 ml = 2,59 mmol/l; n = 9)
    1,64% ($\bar{x}$ = 155,0 mg/100 ml = 4,01 mmol/l; n = 11)

- o von Tag zu Tag (an 20 aufeinanderfolgenden Tagen)
  - fluorimetrische Methode
    2,48% ($\bar{x}$ = 107,3 mg/100 ml $\triangleq$ 2,77 mmol/l)
  - kolorimetrische Methode
    2,35% ($\bar{x}$ = 103,1 mg/100 ml $\triangleq$ 2,67 mmol/l)

Zur Bestimmung des Δ^4-Cholestenons als 4-Nitrophenylhydrazon muß die vorgeschaltete enzymatische Reaktion in wäßriger Lösung (Phosphatpuffer, pH 7,0) ablaufen,

während die Messung des farbigen Hydrazons wegen der besseren Löslichkeit und der größeren Empfindlichkeit in methanolischer Lösung erfolgen sollte. Da ein zunehmend wäßriger Anteil die Empfindlichkeit deutlich verringert, muß das Volumen der wäßrigen Phosphatpuffer-Lösung möglichst niedrig gehalten werden. Leider stören viele Bestandteile im Serum mit Ketofunktionen, weil sie ebenfalls mit 4-Nitrophenylhydrazin reagieren. Aus diesem Grund wurde dieser Test in den o.a. Methodenvergleich nicht einbezogen.

Tab.6: Übersicht und Vergleich verschiedener Cholesterol-Bestimmungsmethoden

	Kageyama[10]	Trinder[12]	Meiattini[28]	Haeckel[13]	Merckotest[14]	Fluorimetr.	MBTH DMAB	PNPH
ε-Wert	8000	4264	5156	6180			33000	23469
λ max nm	405	500	500	334	365	λ_f=410 λ_{ex}=315	590	540
Zeit min	60	15	15	20	30	15	20	50
Präzision VK%								
in Serie	2,0	1,0	1,4			1,66-1,87	1,45-1,88	n.g.
von Tag zu Tag	3,0	1,8-3,1	4,8	2,7-7,1	2,1-2,8	2,5	2,4	n.g.
Temp. °C	37	37	37	Raumtemp.	25	37	37	50
Cholesteroloxidase U/Test	0,10	0,35	0,50	0,08	0,06	0,016	0,10	0,05
Serum ul	20	30	20	10-20	10	10	10	10

n.g. = nicht gemessen

Im Vergleich zu anderen Methoden (Tab.6) fällt die hohe Empfindlichkeit der drei ausgearbeiteten Tests auf. Das Probenvolumen und die Cholesteroloxidase-Menge konnten daher deutlich reduziert werden. Dadurch verringert sich der Preis einer Bestimmung erheblich. Im Vergleich zu der Kageyama-Methode[10] ist die Analysendauer der fluorimetrischen und der kolorimetrischen Methode mit MBTH/DMAB sehr kurz. Letztere weisen hohe Präzisionen auf, welche auch bei der Bestimmung nach Trinder nicht erreicht werden.

IV Experimenteller Teil

Reagenzien

- Cholesterol (Merck Art. 24 622)
- Cholesterol-Standardlösung 5,0 mg/ml in Isopropanol (Sigma Nr. 965-25)
- Kaliumdihydrogenphosphat (Merck Art. 4873)
- di-Natriumhydrogenphosphat-2-Hydrat (Merck Art. 6580)
- Triton X-100 (Isooctyl-Phenoxypolyethoxy-Ethanol; Serva Feinbiochemica Heidelberg 37 238)
- Cholesteroloxidase (EC 1.1.3.6 von Nocardia erthropolis; Boehringer Mannheim GmbH Nr. 126 934)
- Cholesterolesterase (EC 3.1.1.13 von Mikroorganismus; Boehringer Mannheim GmbH Nr. 393 916)
- Peroxidase (EC 1.11.1.7; Merck Art. 24 567)
- 4-Hydroxyphenylessigsäure (Serva Feinbiochemica, Heidelberg 25 765)
- 3-Methyl-benzothiazolin-2-on-hydrazon Hydrochlorid Hydrat (EGA 12,973-9)
- 3-Dimethylaminobenzoesäure(Fluka AG 39 100)
- 4-Nitrophenylhydrazin
- N,N-Dimethylformamid (Merck, Uvasol 8 572 736)
- Natronlauge (in Lösung 1 mol/l)

Herstellung der Reagenzienlösungen

Standardcholesterollösungen

1,29, 2,59, 3,87, 5,17, 6,47, 7,76 und 10,34 mmol/l werden von 50, 100, 150, 200, 250, 300 und 400 mg Cholesterol in 100 ml Ethanol hergestellt.

4-Hydroxyphenylessigsäure

17,5 mmol von 4-Hydroxyphenylessigäsure werden in 1000 ml Phosphatpuffer pH 8,0 gelöst.

3-Methyl-benzothiazolin-2-on-hydrazon

6,0 mmol von MBTH werden in 1000 ml Phosphatpuffer pH 7,0 gelöst.

3-Dimethylaminobenzoesäure

12,1 mmol von DMAB werden in 1000 ml Phosphatpuffer pH 7,0 gelöst.

4-Nitrophenylhydrazin

20,0 mg von 4-Nitrophenylhydrazin werden in 10,0 ml Methanol und 2,0 ml konz.Salzsäure gelöst und mit Methanol auf 50,0 ml verdünnt.

Pufferlösung

KH_2PO_4/ Na_2HPO_4, 0,1 mol/l: pH 7,0 und pH 8,0

pH 7:

22,4 ml 0,1 molare Kaliumhydrogenphosphatlösung und 25,8 ml 0,1 molare di-Natriumhydrogenphosphatlösung werden gemischt und mit dest.Wasser zu 1000 ml aufgefüllt.

pH 8:

Eine 0,1 molare di-Natriumhydrogenphosphatlösung wird mit 0,1 molarer Kaliumhydrogenphosphatlösung auf pH 8 eingestellt.

Geräte

Fluorimeter

Die Messungen erfolgten mit einem BAIRO-ATOMIC FLUORI-POINT-Spectrofluorimter. Der Fluorimeter wurde täglich mit einer Standardcholesterollösung (400 mg/100 ml ≙ 10,34 mmol/l) unter den Testbedingungen standardisiert.

Photometer

Die Messungen erfolgten mit einem Beckman Spectrophotometer Modell 24.

Küvetten

Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke

Rotationsmischer

Wasserbad

Es muß auf 37°C thermostatisierbar sein und über einen Einsatz für Reaktionsgefäße verfügen.

Pipetten

Eppendorf-Pipetten 10, 100, 500 und 1000 µl wurden für die Pipettierung des Serums, Substrat und Reagenzien verwendet.

zu II.2 Fluorimetrische Methode

zu II.2(1) Reaktionsbedingungen

pH-Wert

Das Maximum der Oxidationsreaktion wird in einem Phosphatpuffer mit pH 8,0 erreicht.

Tab.7: Einfluß des pH-Wertes auf die fluorimetrische Methode

pH-Wert	Fluoreszenz
7,0	32,6
7,2	43,0
7,4	60,3
7,6	82,0
7,8	96,4
7,0	100,0
8,2	92,0

\+ Cholesterolkonzentration 400 mg/100 ml

Triton X-100

Die optimale Konzentration von Triton X-100 für die vollständige Oxidation des Cholesterols beträgt 0,003 ml pro Bestimmung.

Tab.8: Einfluß des Triton X-100 auf die fluorimetrische Methode

Triton X-100 ml/100 ml	Fluoreszenz
1,0	83,1
2,0	96,4
3,0	100,0
4,0	97,5
5,0	93,6

+ Cholesterolkonzentration 400 mg/100 ml

4-Hydroxyphenylessigsäure

Für eine maximale Reaktion des Cholesterols sind 0,266 mg 4-Hydroxyphenylessigsäure pro Bestimmung ausreichend.

Tab.9: Einfluß der 4-Hydroxyphenylessigsäurekonzentration auf die fluorimetrische Methode

4-Hydroxyphenylessigsäure mmol/l	Fluoreszenz
8,7	88,4
17,5	100,0
26,2	95,4
35,0	89,1
43,7	79,9
52,5	75,5

+ Cholesterolkonzentration 400mg/100ml

Cholesteroloxidase

Für die quantitative Oxidation des freien Cholesterols sind 0,016 U Cholesteroloxidase pro Bestimmung ausreichend.

Tab.10: Einfluß der Cholesteroloxidase-Aktivität auf die fluorimetrische Methode

Cholesteroloxidase U/ml	Fluoreszenz
0,08	59,2
0,16	100,0
0,24	99,7
0,32	99,6
0,40	99,4

\+ Cholesterolkonzentration 400 mg/100 ml

Peroxidase

Die vollständige Reaktion des entstehenden H_2O_2 wird mit 6,4 U Peroxidase pro Bestimmung erreicht.

Tab.11: Einfluß der Peroxidase-Aktivität auf die fluorimetrische Methode

Peroxidase U/ml	Fluoreszenz
16	60,8
32	84,0
48	95,7
64	100,0
80	99,6

\+ Cholesterolkonzentration 400 mg/100 ml

Kinetik der Reaktion

Das Maximum der Reaktionsentwicklung wird bei 37°C in 15 min erreicht.

Tab.12: Kinetik der Reaktion der fluorimetrischen Methode

Zeit (min)	Fluoreszenz	
	Cholesterol (200 mg/100 ml)	Cholesterol (400 mg/100 ml)
5	36,3	60,9
10	46,8	81,4
15	49,6	100,0
20	49,8	100,3
25	49,8	100,0

Tab.13: Die Stammlösungen der Reagenzien im Reaktionsgemisch der fluorimetrischen Methode

4-Hydroxyphenylessigsäure	17,5 mmol/l
Triton X-100	3,0 ml/100 ml
Peroxidase	64,0 U/ml
Cholesteroloxidase	0,16U/ml
Cholesterolesterase	40,0 U/ml
$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,1 mol/l
KH_2PO_4	0,1 mol/l
pH-Wert	8,0

Tab.14: Arbeitsvorschrift für die enzymatische fluorimetrische Cholesterolbestimmung im Serum

Probe	10 µl
Phosphatpuffer pH 8,0	2500 µl
Trition X-100	100 µl
Peroxidase	100 µl
4-Hydroxyphenylessigsäure	100 µl
Cholesteroloxidase	100 µl
Cholesterolesterase	10 µl

gut mischen und für 15 min bei 37°C inkubieren.
Dann mißt man die Fluoreszenz bei 410 nm (λ_{ex}= 315 nm)

Zu II.2.(2) Prüfung der Methode

Linearität

a) Eichgerade für Standard-Cholesterollösungen, bestimmt mit der fluorimetrischen Methode

Tab.15: Meßwerte für Standard-Cholesterollösungen

Cholesterol mg/100 ml	Fluoreszenz bei 410 nm (λ_{ex}= 315 nm)
50,0	12,9
100,0	27,0
150,0	37,0
200,0	48,9
250,0	63,2
300,0	74,0
400,0	100,0

Es sind jeweils die Mittelwerte aus drei Bestimmungen angegeben.

Auswertung der Eichgerade

Unter den Testbedingungen verläuft die Eichgerade linear bis zu einer Cholesterolkonzentration von 400 mg/100 ml (≙ 10,34 mmol/l).

Gleichung der Eichgerade: $y = 0{,}7063 + 0{,}246\ x$

b) Eichgerade mit Albuminzusatz

Herstellung des künstlichen Serums:

Die Serumalbuminkonzentration wird mit 3,8 - 4,6 g/100 ml (≙ 0,57 - 0,69 mol/l) angegeben[1]. Diese Albuminmenge sollte den Cholesterollösungen zugesetzt werden zur Erstellung einer Eichgerade mit künstlichem Serum.

Durchführung:

1) Herstellen eines Albuminkonzentrats mit 84 mg/ml (≙ 1,24 µmol/l) d.h. mit doppelter Albuminmenge.

2) Mischen von gleichen Volumina Albuminkonzentrat und Cholesterollösungen zu künstlichem Serum.
(Dieses Vorgehen gewährleistet eine gleichbleibende Albuminkonzentration in der ganzen Versuchsreihe. Wird Albumin für jede Cholesterolkonzentration getrennt eingewogen, kann es zu starken Schwankungen der Meßwerte kommen, bedingt durch Wägefehler).

Tab.16: Meßwerte der Cholesterolalbumin-Eichgeraden

Cholesterol mg/ml	Fluoreszenz
50,0	13,0
100,0	24,0
200,0	50,0
250,0	61,4
300,0	73,6
400,0	99,0

Es sind jeweils die Mittelwerte aus drei Bestimmungen angegeben.

Auswertung:
Unter den Testbedingungen verläuft die Eichgerade linear bis zu einer Cholesterolkonzentration von 400 mg/100 ml (≙ 10,34 mmol/l). Gleichung der Eichgeraden: $y = 0{,}3292+0{,}246\ x$

c) Wiederfindung von zugesetztem reinem Cholesterol

Tab.17: Wiederfindungsrate von zugesetztem reinem Cholesterol

Zugesetzte Menge mg/100 ml	mmol/l	Cholesterol gefunden mg/100 ml	Wiederfindung %
50,0	1,29	50,7	101,4
50,0	1,29	50,3	100,6
100,0	2,59	100,5	100,5
100,0	2,59	101,7	101,5
150,0	3,87	148,8	99,2
150,0	3,87	149,2	99,5
200,0	5,17	197,5	98,8
200,0	5,17	201,1	100,6
250,0	6,47	248,6	99,4
250,0	6,47	250,5	100,2
300,0	7,76	302,0	100,7
300,0	7,76	302,8	100,9

Richtigkeit

Tab.18: Ergebnisse der Zusatzversuche

Serum	zugesetztes Cholest. mg/100ml	Gesamt-Cholest. mg/100ml	Fluores-zenz	Gefundenes Cholesterol mg/100ml	mmol/l	Theorie Cholesterol mg/100ml	mmol/l	% der Theo-rie
I	0	108,0	27,1	108,0	2,79	108,0	2,79	--
	50,0	158,0	40,0	158,8	4,11	158,0	4,09	100,5
	100,0	208,0	52,1	206,8	5,35	208,0	5,38	99,4
	200,0	308,0	77,4	307,3	7,95	308,0	7,96	99,8
II	0	158,0	39,7	158,0	4,09	158,0	4,09	--
	50,0	208,0	52,2	207,2	5,36	208,0	5,38	99,6
	100,0	258,0	64,5	256,0	6,62	258,0	6,67	99,2
	200,0	358,0	90,0	357,3	9,24	358,0	9,26	99,8

Tab.19: Ergebnisse der Mischversuche

Serum	Fluores-zenz	Cholesterol mg/100 ml	mmol/l	Theorie mg/100 ml	% der Theorie
1	27,2	108,0	2,79	--	--
2	23,6	94,0	2,43	--	--
3	39,8	158,0	4,09	--	--
1+2	25,2	100,0	2,59	101,0	99,0
1+3	33,4	132,6	3,43	133,0	99,7
2+3	31,9	126,6	3,27	126,0	100,5

Präzision

Berechnung von Standardabweichung und relativer Standardabweichung:

$$S = \pm \sqrt{\frac{(\bar{X} - X)^2}{n - 1}}$$

$$S_{rel} = VK = \frac{S \cdot 100}{\bar{X}} \quad \%$$

S = Standardabweichung
X = Einzelwert
$\bar{X}$ = Anzahl der Einzelwerte
S_{rel} = relative Standardabweichung
VK = Variationskoeffizient

Präzision in Serie

n Bestimmungen eines Serums von bekanntem Gehalt wurden an einem Tag hintereinander durchgeführt.

1) Zahl der Bestimmungen: n = 12
   Mittelwert: 107 mg Cholesterol/100 ml (≙ 2,77 mmol/l)
   Standardabweichung: S = ± 1,67 mg Cholesterol
   (≙ ± 0,043 mmol/l)
   relative Standardabweichung: S_{rel} = VK = 1,56%

2) Zahl der Bestimmungen: n = 12
   Mittelwert: 93,7 mg Cholesterol/100 ml (≙ 2,24 mmol/l)
   Standardabweichung: S = ± 1,57 mg Cholesterol
   (≙ 0,041 mmol/l)
   relative Standardabweichung: S_{rel} = VK = 1,68%

3) Zahl der Bestimmungen: n = 8
Mittelwert: 160,36 mg Cholesterol/100 ml (≙ 4,15 mmol/l)
Standardabweichung: S = ± 3,0 mg Cholesterol
(≙ 0,078 mmol/l)
relative Standardabweichung: S_{rel} = VK = 1,87%

Störanfälligkeit

a) durch endogene Substanzen

Tab.20: Einfluß von endogenen Substanzen auf die enzymatische Cholesterolbestimmung

Substanz	Normalwert[20] im Serum mg/100 ml	Zugesetzte Menge mg/100 ml	Cholesterol gefunden mg/100 ml
Kreatinin	0,47-1,10	25,0	199,0
Glucose	61 - 130	1000	199,1
Bilirubin	0,26-1,40	20,0	199,2
Harnsäure	1,82-7,64	25,0	198,4
Harnstoff	12,20-43,30	100,0	201,7
Ascorbinsäure	0,2 - 1,4	20,0	199,3

Die Cholesterolkonzentration betrug jeweils 200 mg/100 ml Serum (≙ 5,17 mmol/l). Es sind die Mittelwerte aus drei Bestimmungen angegeben.

b) durch Pharmaka

Tab.21: Wiederfindungen von Cholesterol in künstlichem Serum in Gegenwart von Pharmaka

Name	Konz. mg/l	Cholest. Konz. mmol/l	Name	Konz. mg/l	Cholest. Konz. mmol/l
Acenocoumarol	300	5,20	Codein	250	5,11
Acetylsalicylsäure	1000	5,19	Diethylstilboes - trol	200	5,22
Amantadin-HCl	300	5,21	L-Ephedrin-HCl	250	5,15
Aminophenazon	400	5,13	Etophyllin	500	5,15
Benzylpenicillin	1000	5,15	Furosemid	200	5,12
Bisacodyl	300	5,12	Glutethimid	300	5,10
Buscopan	300	5,15	Hydrochlorothia- zid	250	5,23
Chloramphenicol	750	5,13	Hydrocortison	250	5,17
Chlordiazepoxid	200	5,19	Imipramin-HCl	300	5,20
Chloroquin- diphosphat	300	5,10	Indometacin	150	5,16
Chlorpromazin	250	5,18	Isoniazid	400	5,08
Neostigmin-Br	250	5,12	Meprobamat	300	5,17
Nicotinamid	300	5,14	Streptomycin	400	5,20
Paracetamol	400	5,06	Sulfadimethoxin	400	5,10
Pentetrazol	400	5,14	Sulfathiourea	400	5,13
Phenobarbital	200	5,20	Theophyllin	400	5,03
Phenylbutazon	400	5,19	Tolbutamid	400	5,18
Phenytoin	250	5,21	Na-Citrat	3800	5,18
Pyridoxin-HCl	150	5,24	Na-Oxalat	2000	5,19

Die Gesamtcholesterolkonzentration ist 5,17 mmol/l (≙200mg/100 ml). Es sind jeweils die Mittelwerte aus drei Bestimmungen angegeben.

Eichgerade im UV-Bereich

Das Oxidationsprodukt der fluorimetrischen Reaktion absorbiert auch im UV-Bereich. Die Extinktion kann bei einer Wellenlänge von 242 nm gemessen werden.

Tab.22: Meßwerte für Standard-Cholesterollösungen

Cholesterol mg/100 ml	Extinktion bei 242 nm
50,0	0,180
100,0	0,340
150,0	0,510
200,0	0,700
250,0	0,870
300,0	1,030
400,0	1,380

Es sind jeweils die Mittelwerte aus drei Bestimmungen angegeben.

Tab.23: Wiederfindung von zugesetztem reinem Cholesterol

Zugesetzte Menge mg/100ml	mmol/l	Cholesterol gefunden mg/100 ml	Wiederfindungen %
50,0	1,29	49,3	98,7
100,0	2,59	99,5	99,5
150,0	3,87	150,6	100,4
200,0	5,17	198,5	99,2
250,0	6,47	249,5	99,8
300,0	7,76	297,7	99,2
400,0	10,34	400,4	100,1

Zu II.3. Kolorimetrische Methode (Umsetzung mit MBTH, DMAB)

Zu II.3.(1) Reaktionsbedingungen

Triton X-100

Für eine maximale Reaktion von 10,34 mmol/l (≙ 400 mg/100 ml) Cholesterol sind 0,005 ml Triton X-100 pro Bestimmung ausreichend.

Tab.24: Einfluß des Triton X-100 auf die kolorimetrische Methode

Triton X-100 ml/100 ml	Extinktion bei 590 nm
2,0	0,700
3,0	0,920
4,0	0,990
5,0	1,010
6,0	0,940

Cholesteroloxidase-Aktivität

Für die quantitative Oxidation des freien Cholesterols bis zu 10,34 mmol/l bei 37°C reichen 0,1 U Cholesteroloxidase pro Test aus.

Tab.25: Einfluß der Cholesteroloxidase-Aktivität

Cholesterol-oxidase U/ml	Cholesterol 200mg/100ml	Cholesterol 400mg/100ml
0,25	0,380	0,809
0,50	0,470	0,943
0,75	0,550	1,025
1,00	0,550	1,113
1,25		1,113

Peroxidase-Aktivität

Das Maximum der Farbreaktion ist mit 8 U Peroxidase pro Test erreicht.

Tab.26: Einfluß der Peroxidase-Aktivität

Peroxidase U/ml	Extinktion Cholesterol 200mg/100ml	Cholesterol 400mg/100ml
32	0,390	0,869
48	0,480	0,980
64	0,520	1,030
80	0,565	1,056
96	0,565	1,056

Tab.27: Einfluß der MBTH-Konzentration

MBTH mmol/l	Extinktion Cholesterol 200mg/100ml	Cholesterol 400mg/100ml
2,4	0,300	0,899
3,6	0,410	0,980
4,8	0,483	1,068
6,0	0,563	1,133
7,2	0,542	1,100

Tab.28: Einfluß der DMAB-Konzentration

DMAB mmol/l	Extinktion Cholesterol 200mg/100ml	Cholesterol 400mg/100ml
4,0	0,309	0,900
8,1	0,480	0,997
12,1	0,532	1,037
16,1	0,461	1,020
20,2	0,400	0,940

Tab.29: Die Stammlösungen der Reagenzien im Reaktionsgemisch	
$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,1 mol/l
KH_2PO_4	0,1 mol/l
Triton X-100	5,0 ml/100 ml
MBTH	6,0 mmol/l
DMAB	12,1 mmol/l
Peroxidase	80,0 U/ml
Cholesteroloxidase	1,0 U/ml
Cholesterolesterase	40,0 U/ml

Tab.30: Arbeitsvorschrift für die kolorimetrische Methode		
	Probe	Probenleerwert
Phosphatpuffer pH 7,0	1000 µl	1100 µl
Triton X-100	100 µl	100 µl
MBTH	100 µl	100 µl
DMAB	1500 µl	1500 µl
Peroxidase	100 µl	100 µl
Cholesteroloxidase	100 µl	--
Cholesterolesterase	10 µl	10 µl
gut mischen und für 5 min bei 37°C inkubieren		
Serum	10 µl	10 µl
gut mischen und weitere 15 min bei 37°C erwärmen. Dann mißt man die Extinktion bei 590 nm gegen den Probenleerwert.		

Zu II.3.(2) Prüfung der Methode

Linearität

Tab.31: Meßwerte für Standard-Cholesterollösungen

Cholesterol mg/100 ml	Extinktion bei 590 nm
25,0	0,070
50,0	0,146
100,0	0,295
150,0	0,435
200,0	0,591
250,0	0,750
300,0	0,883
400,0	1,183

Tab.32: Meßwerte der Cholesterolalbumin-Eichgerade

Cholesterol mg/100 ml	Extinktion bei 590 nm
50,0	0,140
100,0	0,297
150,0	0,436
200,0	0,594
250,0	0,746
300,0	0,895
400,0	1,180

Tab.33: Wiederfindungsraten von zugesetztem reinen Cholesterol

Zugesetzte Menge mg/100 ml	Cholesterol gefunden mg/100ml	Wiederfindungsraten
25,0	24,9	99,6
25,0	25,3	101,2
50,0	49,5	99,0
50,0	50,2	100,4
100,0	101,1	101,1
100,0	100,7	100,7
150,0	148,5	99,0
150,0	148,9	99,3
200,0	199,4	99,7
200,0	198,4	99,2
250,0	252,7	101,1
250,0	251,3	100,5
300,0	300,5	100,2
300,0	298,8	99,6
400,0	402,9	100,7
400,0	399,5	99,8

Richtigkeit

Tab.34: Ergebnisse der Zusatzversuche

Serum	zugesetzte Cholest. mg/100ml	Gesamt-Cholest. mg/100ml	Extinktion	Gefundenes Cholesterol mg/100ml	Gefundenes Cholesterol mmol/l	Theorie Cholesterol mg/100ml	Theorie Cholesterol mmol/l	% der Theorie
I	0	104,0	0,308	104,0	2,69	104,0	2,69	--
	50,0	154,0	0,450	152,5	3,94	154,0	3,98	99,0
	100,0	204,0	0,600	203,4	5,26	204,0	5,28	99,7
	200,0	304,0	0,904	306,4	7,92	304,0	7,86	100,8
II	0	155,0	0,457	155,0	4,00	155,0	4,00	--
	50,0	205,0	0,610	206,8	5,35	205,0	5,30	100,9
	100,0	255,0	0,746	252,9	6,54	255,0	6,59	99,2
	200,0	355,0	1,058	358,6	9,27	355,0	9,18	101,0

Tab.35: Ergebnisse der Mischversuche

Serum	Extinktion	Cholesterol mg/100ml	Cholesterol mmol/l	Theorie mg/100 ml	% der Theorie
1	0,308	104,0	2,69	--	--
2	0,296	100,0	2,60	--	--
3	0,457	155,0	4,00	--	--
1+2	0,300	101,7	2,63	102,0	99,7
1+3	0,386	130,8	3,38	129,5	101,0
2+3	0,377	127,8	3,30	127,5	100,2

Präzision in der Serie

Berechnung der Standardabweichung siehe S.70
n Bestimmungen eines Serums von bekanntem Gehalt wurden an einem Tag hintereinander durchgeführt.

a) Zahl der Bestimmungen: n = 12
Mittelwert: 104 mg Cholesterol/100 ml (≙ 2,69 mmol/l)
Standardabweichung: S=±1,51 mg Cholesterol
(≙ ± 0,039 mmol/l)
relative Standardabweichung: S_{rel}= VK = 1,45%

b) Zahl der Bestimmungen: n = 9
Mittelwert: 100 mg Cholesterol/100 ml (≙ 2,60 mmol/l)
Standardabweichung: S= ± 1,88 mg Cholesterol
(≙ ± 0,049 mmol/l)
relative Standardabweichung: S_{rel}= VK = 1,88%

c) Zahl der Bestimmungen: n = 11
Mittelwert: 155 mg Cholesterol/100 ml (≙ 4,00 mmol/l)
Standardabweichung: S = ± 2,54 mg Cholesterol
(≙ ± 0,066 mmol/l)
relative Standardabweichung: S_{rel}= VK = 1,64%

Störanfälligkeit

Tab.36: Einfluß von endogenen Substanzen auf die kolorimetrische Cholesterolbestimmung

Substanz	Normalwert[20] im Serum mg/100 ml	Zugesetzte Menge mg/100 ml	Cholesterol gefunden mg/100 ml
Kreatinin	0,47-1,10	25,0	199,6
Glucose	61,00-130,00	1000,0	200,8
Bilirubin	0,26-1,40	20,0	198,9
Harnsäure	1,82-7,64	25,0	199,4
Harnstoff	12,20-43,30	100,0	200,0
Ascorbinsäure	0,2-1,4	20,0	199,0

Die Cholesterolkonzentration betrug jeweils 200 mg/100 ml Serum (≙ 5,17 mmol/l). Es sind die Mittelwerte aus drei Bestimmungen angegeben.

Tab.37: Wiederfindungsraten von Cholesterol in künstlichem Serum in Gegenwart von Pharmaka

Name	Konz. mg/l	Cholest. Konz. mmol/l	Name	Konz. mg/l	Cholest. Konz. mmol/l
Acenocoumarol	300	5,20	Hydrochlorothiazid	250	5,13
Acetylsalicylsäure	1000	5,15	Hydrocortison	250	5,10
Amantadin-HCl	300	5,12	Imipramin-HCl	300	5,15
Aminophenazon	400	5,10	Indometacin	150	5,20
Benzylpenicillin	1000	5,18	Isoniazid	400	5,08
Bisacodyl	300	5,14	Meprobamat	300	5,12
Buscopan	300	5,09	Neostigmin-Br	250	5,16
Chloramphenicol	750	5,08	Nicotinamid	300	5,14
Chlordiazepoxid	200	5,11	Paracetamol	400	5,18
Chloroquin-diphosphat	300	5,13	Pentetrazol	400	5,13
Chlorpromazin	250	5,24	Phenobarbital Na	200	5,19
Codein	250	5,06	Streptomycin SO_4	400	5,09
Diethylstilbe-strol	200	5,19	Sulfadimethoxin	400	5,12
L-Ephedrin-HCl	250	5,22	Sulfathiourea	400	5,15
Etophyllin	500	5,16	Theophyllin	400	5,13
Furosemid	200	5,17	Tolbutamid	400	52,0
Glutethimid	300	5,21			

Die Gesamtcholesterolkonzentration im künstlichen Serum beträgt 5,17 mmol/l (≙ 200 mg/100 ml).
Es sind die Mittelwerte aus drei Bestimmungen angegeben.

Zu II.4. Kolorimetrische Methode (Umsetzung mit 4-Nitrophenylhydrazin)

Tab.38: Arbeitsvorschrift

	Probe	Probenleerwert
Serum	10 µl	10 µl
Phosphatpuffer pH 7,0	50 µl	150 µl
Triton X-100	100 µl	100 µl
Cholesteroloxidase (0,5 U/ml)	100 µl	--
Cholesterolesterase (40 U/ml)	10 µl	10 µl
gut mischen und für 10 min bei 37°C inkubieren		
Methanol	250 µl	250 µl
4-Nitrophenylhydrazin	500 µl	500 µl
gut mischen und für 40 min bei 50°C erwärmen		
Dimethylformamid	5,0 ml	5,0 ml
1 N Natronlauge	500 µl	500 µl
Dann mißt man die Extinktion bei 540 nm gegen den Probenleerwert.		

Tab.39: Meßwerte für Standardcholesterollösungen

Cholesterol mg/100 ml	Extinktion bei 540 nm
50,0	0,045
100,0	0,099
150,0	0,140
200,0	0,185
250,0	0,230

Tab.40: Wiederfindungsraten von zugesetztem reinem Cholesterol

Zugesetzte Menge mg/100ml	mmol/l	Cholesterol gefunden mg/100 ml	Wiederfindungs-rate
50,0	1,29	49,2	98,4
100,0	2,59	101,7	101,7
150,0	3,87	148,8	99,2
200,0	5,17	199,1	99,6
250,0	6,47	250,5	100,2

Tab.41: Ergebnisse der Cholesterolbestimmungen nach den Methoden M1 - M4

Serum	M1	M2	M3	M4
01	4,2	4,0	4,1	4,1
02	6,9	6,7	6,6	6,5
03	9,5	9,2	9,4	9,3
04	3,7	3,8	3,8	3,6
05	6,2	6,2	6,0	6,3
06	7,4	7,4	7,1	7,4
07	6,8	6,7	6,7	6,4
08	7,3	7,2	7,0	7,1
09	4,7	4,6	4,8	4,4
10	7,5	7,3	7,6	7,0
11	5,0	4,8	4,8	4,9
12	5,0	4,9	5,1	5,0
13	4,2	4,2	4,0	4,1
14	4,1	5,0	4,9	5,1
15	4,7	4,8	4,9	5,1
16	2,7	2,6	2,6	2,6
17	4,6	4,8	4,7	5,3
18	6,6	6,5	6,7	5,8
19	5,7	5,5	5,5	5,3
20	7,3	7,4	7,5	6,9
21	5,0	4,7	5,0	4,8
22	7,5	7,2	7,2	7,1
23	4,9	4,9	5,0	4,6
24	5,3	5,2	5,0	4,5
25	6,6	6,7	6,5	6,3

Serum	M1	M2	M3	M4
26	2,6	2,6	2,7	2,5
27	9,8	10,0	10,2	9,5
28	7,5	7,2	7,4	7,4
29	6,6	6,5	6,4	5,9
30	7,5	7,2	7,4	7,2
31	9,9	9,9	10,3	8,9
32	6,8	6,7	6,9	6,6
33	3,4	3,3	3,3	3,6
34	8,9	9,1	8,8	8,6
35	5,8	5,6	5,6	5,5
36	7,6	7,5	7,3	6,8
37	4,6	4,8	4,5	4,7
38	7,6	7,5	7,5	7,5
39	4,0	4,2	4,0	3,8
40	6,8	6,8	6,6	5,6
41	6,5	6,6	6,5	6,5
42	4,7	4,7	4,5	4,9
43	6,5	6,2	6,2	6,0
44	5,0	4,8	5,1	5,0
45	6,8	7,2	7,2	6,7
46	8,3	8,2	8,5	8,1
47	1,7	1,6	1,7	1,5
48	10,0	10,1	10,5	9,8
49	5,4	5,5	5,5	5,2
50	4,8	4,8	5,0	4,9
51	5,3	5.3	5,5	5,2
52	6,2	6,2	6,3	6,5
53	3,3	3,2	3,3	3,1

Serum	M1	M2	M3	M4
54	4,9	4,8	5,0	4,8
55	7,3	7,3	7,5	7,3
56	7,4	7,4	7,5	7,5
57	2,6	2,6	2,7	2,7
58	2,7	2,6	2,6	2,6
59	7,5	7,2	7,3	7,1
60	2,9	2,9	2,8	2,6
61	4,1	4,0	4,0	3,9
62	5,6	5,7	5,5	5,4
63	6,5	6,6	6,5	6,3
64	6,0	6,1	5,8	5,9
65	5,2	5,0	5,0	5,2
66	1,6	1,6	1,5	1,6
67	8,8	8,9	8,6	8,5
68	8,5	8,5	8,6	8,5
69	1,5	1,6	1,5	1,4
70	4,0	4,0	3,9	3,9
71	4,7	4,5	4,5	4,0
72	5,6	4,1	4,5	4,2
73	5,4	5,0	5,0	5,3
74	10,0	10,1	9,7	10,1
75	12,3	12,4	12,0	11,9
76	5,0	4,9	4,8	5,1
77	5,2	5,2	5,0	5,0
78	2,9	2,7	2,7	2,6
79	6,7	6,6	6,5	5,9
80	7,0	5,0	5,5	5,2
81	10,3	7,2	8,0	6,9
82	5,5	5,0	5,1	5,0

V. Anhang

Cholesterol-Oxidation mit Ag_2CO_3/Celite

Das System Ag_2CO_3/Celite wird in der Literatur als Oxidationsmittel für Phenole[48] und Alkohole[49] beschrieben. In Vorversuchen sollte geklärt werden, ob sich dieses Reagens auch zur quantitativen Oxidation von Cholesterol zu Δ^4-Cholestenon eignet.

Herstellung des Ag_2CO_3/Celite-Reagens

Zu 34 g (200 mmol) Silbernitrat in 200 ml Wasser werden 30 g Celite unter ständigem Rühren (Magnetrührer) zugefügt. Sobald die Suspension homogen ist, gibt man unter Umrühren eine Lösung von 30 g (105 mmol) $Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$ in 300 ml Wasser zu. Danach wird noch ungefähr 10 min gerührt, der gelbgrüne Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und im Vakuum langsam getrocknet. Das Reagens enthält ungefähr 1 mmol Ag_2CO_3 auf 0,57 g[42].

Methode

Cholesterol wurde mit Ag_2CO_3/Celite-Reagens in einem Lösungsmittel unter Rückfluß gekocht. Die Versuche wurden mit verschiedenen Cholesterol- und Ag_2CO_3/Celite-Mengen, Lösungsmittelvolumina und Kochzeiten durchgeführt (Tab.42).

Tab.42: Cholesteroloxidation durch Ag_2CO_3/Celite

Versuch Nr.	Cholesterol mmol (g)	Reagens mmol (g)	Lösungsmittel ml	Kochzeit min
1	2,0 (0,772)	16,0 (9,12)	Benzol 120	30
2	1,0 (0,387)	15,0 (8,6)	Benzol 60	180
3	0,5 (0,193)	16,8 (9,6)	Benzol 80	120
4	2,0 (0,773)	10,0 (11,4)	Benzol 100	480
5	2,0 (0,773)	10,0 (11,4)	CH_2Cl_2 100	480

Untersuchung der Reaktionsprodukte

Die Reaktionsprodukte aller Versuche wurden dünnschichtchromatographisch untersucht. Bei (1) sind 3 Flecken auf dem DC erkennbar, es läßt sich aber keiner dem Δ^4-Cholestenon zuordnen (Abb.29).
Unter den Bedingungen von (2) entsteht zwar Δ^4-Cholestenon, es ist aber durch mehrere andere Reaktionsprodukte verunreinigt (Abb.30).
Das gleiche gilt auch für (3) und (4). Unter den Bedingungen von Versuch (3) ist die Oxidationsreaktion nach 30 min, bei (4) nach 60 min abgeschlossen. Nach dieser Zeit läßt sich auf den Dünnschichtchromatogrammen der Reaktionsprodukte keine Veränderung mehr feststellen (Abb.31 und 32).

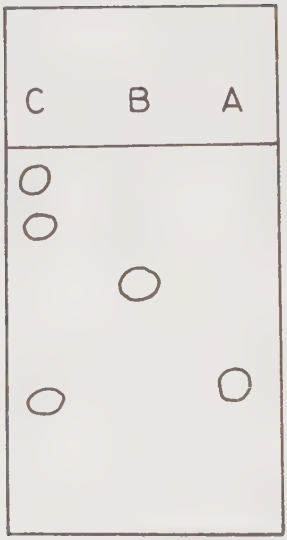


Abb.29: Versuch 1

Fließmittel:
Benzol 7
Diethylether 3
Essigsäure 0,1

Detektion:
Molybdatophosphorsäure

A: Cholesterol
B: Cholestenon
C: Produkte

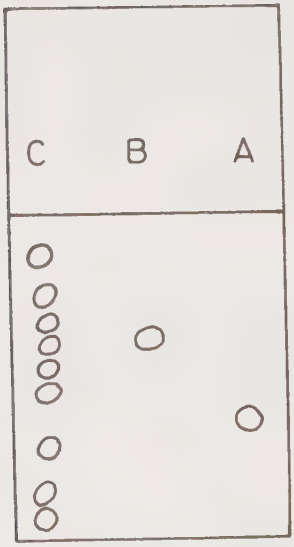
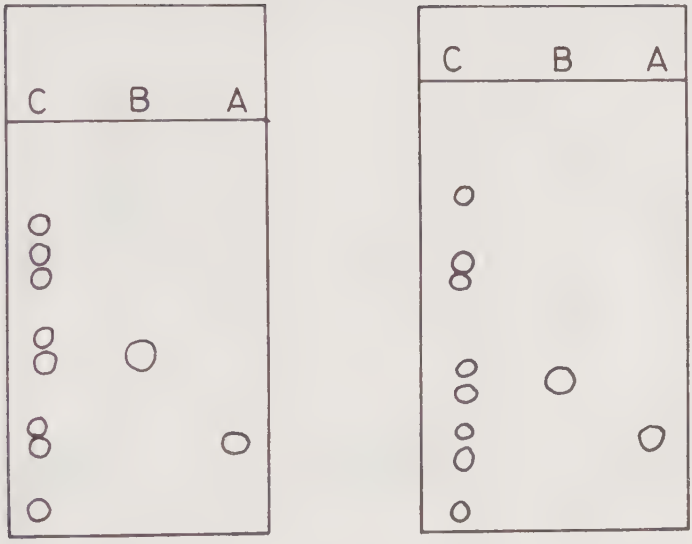


Abb.30: Versuch 2
Fließmittel und
Detektion:
vgl. Abb.29



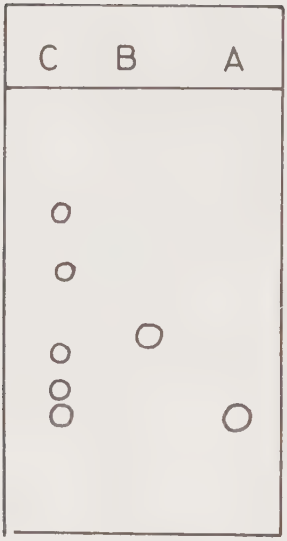
nach 30 min

nach 120 min

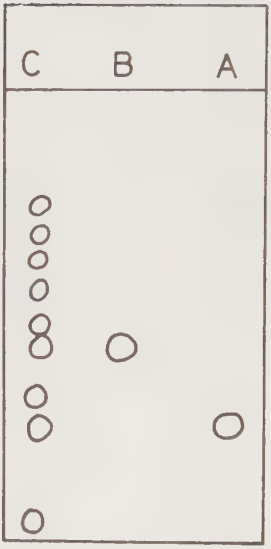
A: Cholesterol
B: Cholestenon
C: Reaktionsprodukte

Abb.31: Versuch 3

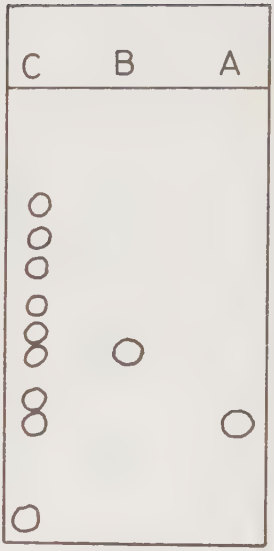
Fließmittel und Detektion: vgl. Abb.29



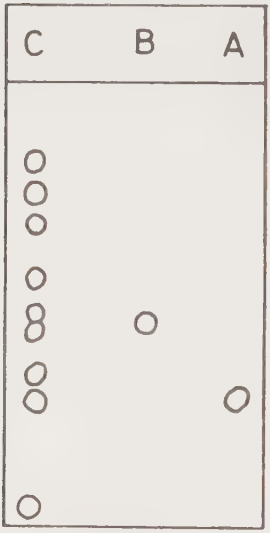
nach 30 min.



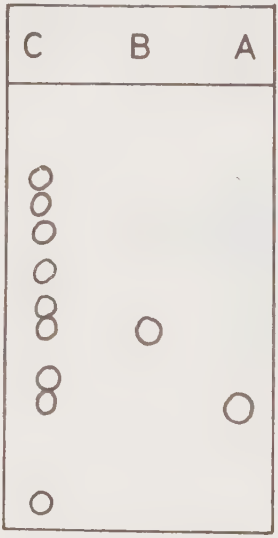
nach 1 Std.



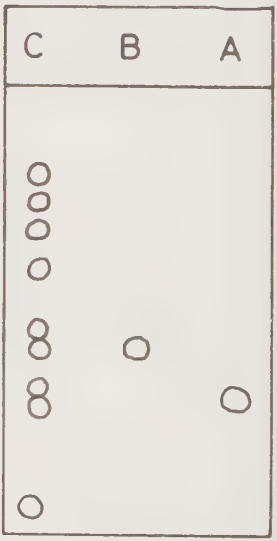
nach 2 Std.



nach 4 Std.



nach 6 Std.

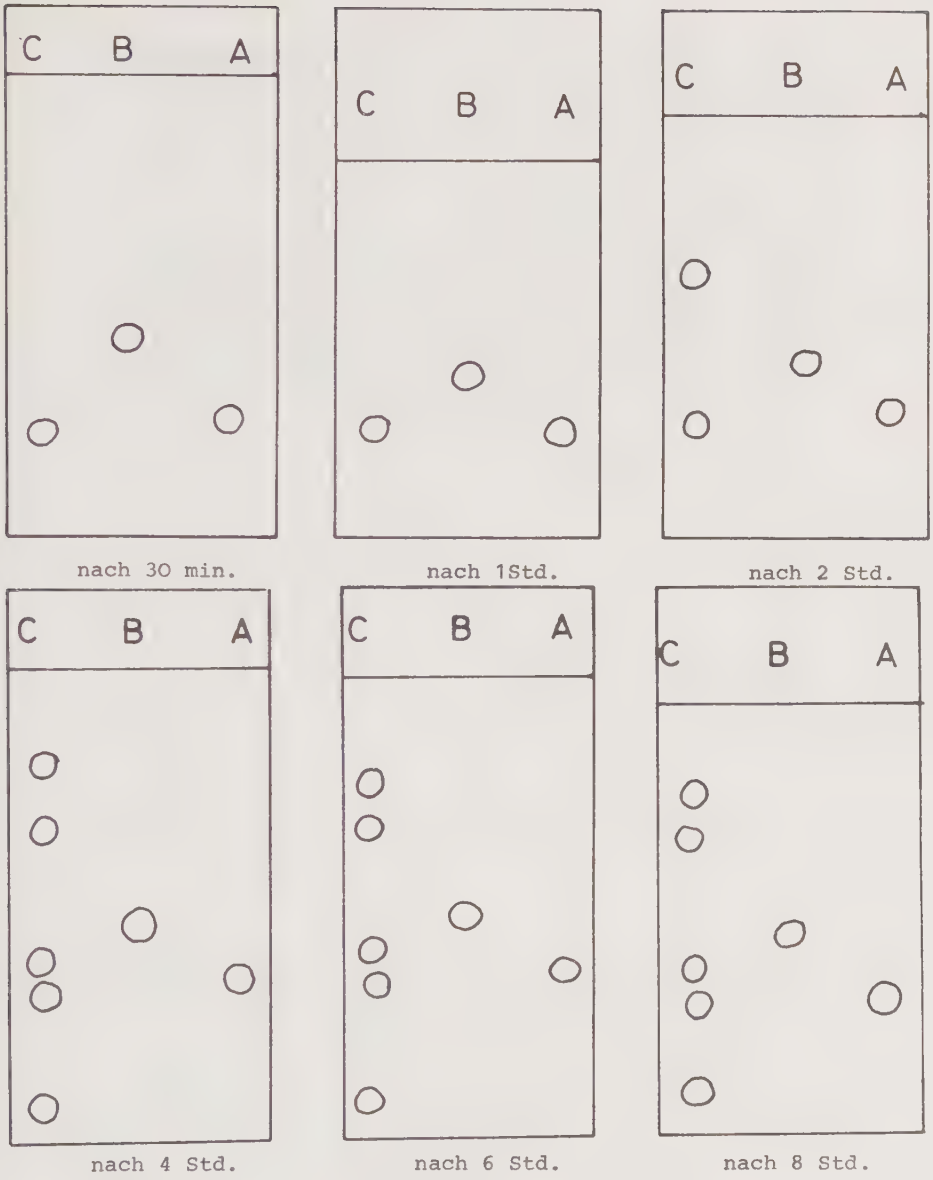


nach 8 Std.

A: Cholesterol B: Cholestenon C: Produkte

Abb.32: Versuch 4

Fließmittel: Toluol + Ethylacetat = 9 + 1
Detektion: vgl. Abb.29



A: Cholesterol B: Cholestenon C: Produkte

Abb.33: Versuch 5

Fließmittel und Detektion: vgl. Abb.32

Abb.33 zeigt, daß unter den Bedingungen von Versuch (5) kein Δ^4-Cholestenon als Oxidationsprodukt entsteht. Die Reaktion ist nach 240 min beendet.

Auswertung der Versuche

Cholesterol läßt sich mit Ag_2CO_3/Celite zu Δ^4-Cholestenon oxidieren. Es entstehen aber gleichzeitig mehrere andere Reaktionsprodukte. Das System Ag_2CO_3/Celite erscheint deswegen zur quantitativen Oxidation von Cholesterol zu Δ^4-Cholestenon ungeeignet.

VI. Literaturverzeichnis

1) R.Richterich, Klinische Chemie, Verlag S.Krager AG, Basel, 4.Aufl. 1978.

2) D.Weisshaar, Med.Welt, Stuttgart, 26, 940(1975)

3) R.Kattermann, Internist 20, 201(1979)

4) G.Schettler, E.Nüssel, Arbeitsmed. Sozialmed. Präventivmed. 10, 25(1975)

5) Liebermann, Ber.Dtsch.Chem. Ges. 18, 1803(1885)

6) Burchard, Chem.Zentbl. 61, 25(1890)

7) W.Richmond, J.Clin.Lab.Invest. 29: suppl. 129(1972)

8) W.Richmond, Clin.Chem. 19, 1350(1973)

9) M.Flegg, Ann.Clin.Biochem. 10, 79(1973)

10) P.Röschlau, E.Bernt und W.Gruber, Z.Klin.Chem.Klin. Biochem. 12, 403(1974)

11) C.C.Allain, L.S.Poon und W.Richmond, Clin.Chem. 20, 470(1974)

12) K.Borner und S.Klose, J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 15, 121(1977)

13) R.Haechel und M.Perlick, J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 14, 411(1976)

14) H.-D.Harders und R.Helger, J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 15, 159(1977)

15) N.Majkic und I.Berkes, Clin.Chim.Acta 80, 121(1977)

16) A.Noma und K.Nakayama, Clin.Chem. 22, 336(1976)

17) L.Siekmann, P.K.Hüskes und H.Breuer, Z.Anal.Chem. 279, 145(1976)

18) E.W.Haeffner und C.J.K.Hoffmann, J.Chromat. 228, 268(1982)

19) R.I.Nicolosi, S.C.Smith und R.F.Santerre, J.Chromat. 60, 111(1971)

20) J.A.French und D.W.Andersen, J.Chromat. 80, 133(1973)

21) F.Peter und R.G.Reynolds, J.Chromat. 143, 153(1977)

22) H.Metzger, Dissertation, Tübingen 1976

23) K.-A.Kovar und M.Schmid, Arch.Pharm.(Weinheim) 312, 780(1979)

24) K.-A.Kovar und G.Löhberg, Arch.Pharm.(Weinheim) 313, 893(1980)

25) N.Kageyama, Clin.Chim.Acta 31, 421(1971)

26) F.Stähler, E.Munz und R.Kattermann, Dtsch.Med.Wschr. 100, 876(1975)

27) P.A.Trinder, Ann.Clin.Biochem. 6, 24(1969)

28) F.Meiattini und F.Bardelli, Clin.Chem. 24, 2161(1978)

29) D.F.Sharman, Brit.J.Pharmacol. 20, 204(1963)

30) T.Sato, J.Lab.Clin.Med. 66, 517(1965)

31) H.Corrodi und B.Werdinius, Acta Chem.Scand. 19, 1854(1965)

32) G.Guilbault, D.N.Kramer und E.Hackley, Anal.Chem. 39, 271(1967)

33) G.Guilbault, P.Brignac und M.Zimmer, Anal.Chem. 40, 190(1968)

34) G.Guilbault, P.Brignac und M.Juneau, Anal.Chem. 40, 1256(1968)

35) G.Guilbault, S.Kuan und P.Brignac, Anal.Chim.Acta 47, 503(1969)

36) Dtsch.Ärzteblatt 68, 2228(1971)

37) Zak, Clin.Chem. 23, 1201(1977)

38) G.A.Cheyne und E.A.Gilmore, Med.Lab.Technol. 30, 191(1973)

39) P.N.Tarbutton und C.R.Gunter, Clin.Chem. 20, 724(1974)

40) E.Sawicki, T.W.Stanely, T.R.Hauser, W.Elbert und J.L.Noe, Anal.Chem. 33, 722(1961)

41) T.T.Ngo und H.M.Lenhoff, Anal.Biochem. 105, 389(1980)

42) D.Barham und P.Trinder, Analyst 97, 142(1972)

43) G.S.Rautela, Clin.Chem. 24, 109(1978)

44) T.Nishina und Y.Sakai, Steroids 4, 255(1964)

45) T.Nishina und M.Kimura, Chem.Pharm.Bull.(Tokyo) 12, 521(1964)

46) M.Kimura und T.Nishina, Chem.Pharm.Bull(Tokyo) 15, 454(1967)

47) L.Sachs, Angewandte Statistik, Springer-Verlag, 5.Auflage 1978

48) V.Balogh, M.Golfier und M.Fetizon, Angew.Chem. 81, 423(1969)

49) M.Fetizon und M.Golfier, C.R.hebd. Sèances Acad.Sci. 267, 900(1968)

Meine akademischen Lehrer außer den Herren Professoren Dr.K.-A.Kovar und Dr.A.M.Wahbi waren die Professoren und Dozenten:

Pharm.Chemie:	H.A.Abdine, M.A.-H.Elsayed, S.Soliman, S.F.Belal, E.Ibrahim, A.Fargaly, A.Omar, Y.Beltagy, S.Reda, R.Soliman
Biologie:	M.R.Saleh, N.Nazmi, A.Metwaly, S.Khafaga
Mikrobiologie:	A. El-Kholi, R.T.Youssef
Pharmakologie:	A.Ghasal, R.Ziton, A.Abdel-Gelil, I.Hamid, A.Basiely, H.P.T.Ammon
Technologie:	M.Abdel-Khalik, A.Metawi, F.El-Khawas, S.A.Khalil, H.M.El-Banna, H.El-Shebini, N.A.Daabis, A.Saleh, M.M.Salib

Lebenslauf

25.12.1951	geboren in El-Behiera, Ägypten als Sohn des Ali El-Yazbi und seiner Ehefrau Hekmat Abdel-Razik
1957 - 1963	Grundschule in El-Mansoura
1963 - 1969	Gymnasium in El-Mansoura (Preparatory and secondary school)
Oktober 1969	Pharmaziestudium an der Universität Alexandria
Juni 1974	Pharmazieabschlußprüfung in Alexandria (Bachelor of pharmaceutical sciences)
Oktober 1974 bis April 1979	Assistent an der Fakultät für Pharmazie der Universität Alexandria
April 1975	Beginn der Magisterarbeit an der Fakultät für Pharmazie der Universität Alexandria unter Anleitung von Prof.Dr.A.M.Wahbi mit dem Titel "The spectrophotometric determination of certain pharmaceutical compounds in eye and nasal drops"
12.August 1977	Magistergrad in Pharmazie (Master of pharmaceutical sciences, pharmaceutical analytical chemistry)
Seit 1978	verheiratet mit Rawya El-Fadly, 2 Kinder im Alter von 3 und 1 Jahr
Seit April 1979	Stipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD)
April-Sept.1979	Deutschkurs am Goethe-Institut, Blaubeuren
Oktober 1979	Beginn der vorliegenden Dissertation